Neues Verfahren zur Flüssigkeits-Chromatographie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Kühlewein
aus Karlsruhe

1965

8095

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0069

Neues Verfahren zur Flüssigkeits-Chromatographie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Kühlewein
aus Karlsruhe

1965

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 1965

Dekan: . . . . . Professor Dr. Peter Roquette

1. Berichterstatter: . . . . . Professor Dr. Ernst Bayer

2. Berichterstatter: . . . . . Professor Dr. Eugen Müller

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. E. Bayer in der Zeit von April 1962 bis September 1962 im Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule "Fridericiana" Karlsruhe und von Oktober 1962 bis August 1964 im Chemischen Institut der "Eberhard-Karls-Universität" Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. E. Bayer

danke ich herzlich für die Stellung des Themas, für die wertvollen Hinweise und freundliche Unterstützung, die mir bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit zuteil wurde.

Herrn Professor Dr. R. Criegee und Herrn Professor Dr. Eugen Müller danke ich für die bereitwillige Überlassung von Institutseinrichtungen.

Inhaltsverzeichnis

A.	THEORETISCHE EINLEITUNG und THEORETISCHE BEHANDLUNG	7
B.	KAPILLAR-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE	17
I.	Grundgerät	17
II.	Einspritzblock	20
III.	Testsubstanzen	23
IV.	Nachweis der getrennten Substanzen	25
V.	Kupferkapillaren	26
1.	Imprägnierung	26
2.	Phasenuntersuchungen	29
VI.	Aluminiumkapillaren	35
1.	Imprägnierung	36
2.	Phasenuntersuchungen	38
VII.	Glaskapillaren	41
1.	Glaskapillaren ohne Füllkörper	41
a.	Glasziehmaschine	41
b.	Imprägnierung	44
c.	Phasenuntersuchungen	45
2.	Glaskapillaren mit Füllkörper	51
a.	Herstellung	51
b.	Imprägnierung	52
c.	Phasenuntersuchungen	52
C.	DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE	56
I.	Gerät zur Stiftsäulen-Chromatographie	57
II.	Beschichtung der Stiftsäule	59
III.	Substanzuntersuchungen	59
D.	ZUSAMMENFASSUNG	62
E.	LITERATURVERZEICHNIS	64

A. THEORETISCHE EINLEITUNG und THEORETISCHE BEHANDLUNG.

Die Chromatographie hat in den vergangenen drei Dezennien seit ihrer Wiederentdeckung eine bedeutende Entwicklung erfahren. Sie ist eine physikalische Trennmethode, bei der die zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen verteilt werden. Eine dieser Phasen ist stationär, die andere beweglich. Letztere durchsickert die stationäre Phase und transportiert dabei die sich trennenden Substanzen. Als stationäre Phasen können Festkörper oder Flüssigkeiten dienen, während als bewegliche Phasen Gase oder Flüssigkeiten möglich sind. Bei der wechselseitigen Kombination dieser vier Phasen erhält man vier chromatographische Verfahren, welche alle experimentell erprobt wurden.

Die Gas-Chromatographie, deren Geburtsstunde nach einem Bericht des Strassburger Wundarztes BRUNSCHWIG (1) bereits am Anfang des 16. Jahrhunderts liegt, ist eine physikalische Trennmethode für unzersetzt verdampfbare Substanzgemische. Ein Vorteil der Gas-Chromatographie gegenüber der Flüssigkeits-Chromatographie ist die schnelle Analysenzeit und die quantitativ gute Auswertbarkeit der Chromatogramme; jedoch ist eine natürliche Begrenzung dieses sehr trennwirksamen Verfahrens gegeben durch das Molekulargewicht, bzw. den maximal möglichen Siedepunkt der zu trennenden Substanzen, der nicht höher als etwa 450° C betragen kann. Durch diese grundsätzliche Beschränkung werden viele wichtige Substanzklassen, z.B. Aminosäuren, Zucker, Hormone, Peptide, Fette, nicht mehr trennbar. Andererseits führt die leichte Zersetzlichkeit auch verdampfbarer Substanzen, z.B. Terpene, ungesättigte Kohlenwasserstoffe, zu einer natürlichen Begrenzung der Gas-Chromatographie. Die Flüssigkeits-Chromatographie hingegen ermöglicht eine Trennung, ohne dass die Substanzen verdampft werden müssen, wenn auch die Registrierung von Substanzen

im Flüssigkeitsstrom grundsätzlich schwieriger ist als die Messung im Gasstrom.

Die Vorteile und Nachteile der Gas- sowie der Flüssigkeits-Chromatographie soll folgende Tabelle 1 veranschaulichen.

Eigenschaft	Gas-Chromatographie	Flüssig.-Chrom.
Detektor	+++	-
Quantitativ	++	-+
Qualitativ	++	++
Schnelligkeit	+++	++ (x)
Trennwirksamkeit	++	+++
Allg.Anwendbarkeit	Kp 450° C	unbeschränkt anwendbar.

(x) nur Dünnschicht- und Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie.

Tab. 1: Vergleiche zwischen Gas- und Flüssigkeits-Chromatographie.

Wurde bisher die Gas-Chromatographie allgemein als sehr trennwirksam angesehen, so überrascht vielleicht in der Tabelle, dass der Flüssigkeits-Chromatographie eine grössere Trennwirksamkeit als der Gas-Chromatographie zugeschrieben worden ist.

Die Trennleistung einer Säule wird nach der Theorie von MARTIN (2) durch die sogenannte theoretische Bodenhöhe ausgedrückt, die aus den Chromatogramm-Aufzeichnungen errechenbar ist. Sie ist definiert als Verhältnis der Säulenlänge zur Anzahl der in der Säule vorhandenen theoretischen Bödenzahlen.

$$H = \frac{l}{n}$$

l = Länge der Säule in cm
n = theoretische Bodenzahl
H = theoretische Bodenhöhe

Während in der Gas-Chromatographie die Trenngüte einer Säule mit diesen Parametern angegeben wird, ist es bisher noch nie unternommen worden, die Bödenzahlen auch bei den einzelnen Verfahren der Flüssigkeits-Chromatographie definitiv auszurechnen, um eine vergleichende Übersicht anstellen zu können. Dies war das erste Ziel dieser Arbeit. Aus bereits lange bekannten analytischen Trennverfahren sind die Böden ausgerechnet worden und nach der Gleichung

$$n = 16 \cdot \left(\frac{\overline{AD}}{\overline{CE}}\right)^2 \qquad (3)$$

n = theoretische Bodenzahl
$\overline{AD}$= Gesamtretentionsvolumen - Start bis Mitte der Bande
$\overline{CE}$= Bandenbreite

In der folgenden Tabelle 2 sind die gemessenen Böden pro m für die einzelnen Chromatographie-Verfahren aufgezeigt.

Typ der Chromatographie	Böden / m
Gas-Chromatographie	2.000
Kapillar-Gas-Chromatographie	1.000
Flüssigkeits-Chromatographie (Stärke-Säule)	10.000
Flüssigkeits-Chromatographie (Verteilungs-Säule)	1.000
Dünnschicht-Chromatographie	50.000
Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie	580

Tab. 2: Bödenzahlen bei verschiedenen Chromatographie-Verfahren.

Der Vergleich zwischen Gas-Chromatographie und Flüssigkeits-Chromatographie zeigt nun die bisher nicht bemerkte Tatsache, dass die Bodenzahl bei der Flüssigkeits-Chromatographie etwa um das Fünffache höher liegt (2.000 : 10.000). Dies liess sich z.B. aus den Chromatogrammen an Stärkesäulen errechnen (4), (5). Zwar sind bei der Flüssig - Flüssig - Verteilungssäule durch die Störungen beim Strömen der flüssigen, beweglichen Phase die Bodenzahlen mit rund 1000 etwas geringer. Aber die Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen ergibt die überraschend hohen Bödenzahlen von 50.000/m (6).

Aus diesen Ergebnissen ist theoretisch zu folgern, dass die Trennwirksamkeit der Flüssigkeits-Chromatographie eindeutig besser ist als bei der Gas-Chromatographie, vor allem wenn sie in sehr dünnen Schichten von 250 µ ausgeführt wird. Die logische Folgerung aus diesem überraschenden Befund dürfte in einer verstärkten Rückkehr zur Flüssigkeits-Chromatographie zu suchen sein. Allerdings dauert die Flüssigkeits-Chromatographie in ihrer normalen Form in gepackten Säulen zu lange. Man sollte deshalb nach Wegen suchen, den Zeitfaktor abzukürzen.

Da eine schnelle Trennung bei analytischen Verfahren erwünscht ist und alle konventionell gepackten Säulen der Flüssigkeits-Chromatographie eine zu geringe Permeabilität aufweisen, wurde die Kapillar-Flüssigkeits-Säule ausgearbeitet. Es wurde ausgegangen von der in der Gas-Chromatographie gewonnenen Erkenntnis, dass innen beschichtete Kapillaren eine grosse Permeabilität aufweisen und schnelle Trennungen bei hohen Bödenzahlen erlauben.

Bevor an die praktische Verwirklichung dieser Idee herangegangen worden ist, musste geprüft werden, ob sich eine solche Erhöhung der Geschwindigkeit der

flüssigen, beweglichen Phase überhaupt theoretisch verwirklichen lässt und eine Bearbeitung des Problems sinnvoll ist. Denn von der Gas-Chromatographie weiss man, dass es nur eine Gasgeschwindigkeit gibt, bei der eine optimale Trennleistung der Säule auftritt. Jenseits dieses Maximums tritt bei kleineren Gasgeschwindigkeiten ein rapider Abfall der Bodenhöhen auf. Bei höheren Gasgeschwindigkeiten fällt die Trennleistung langsamer ab. Für die Abhängigkeit der die Trennleistung einer gaschromatischen Säule charakterisierenden Bodenhöhe H von der linearen Gasgeschwindigkeit u hat van DEEMTER (7) aus kinetischen Überlegungen eine Gleichung abgeleitet:

$$H = 2\lambda d_p + 2\frac{\gamma D_G}{u} + \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k'}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_F} \cdot u$$

In der vereinfachten Form dieser Gleichung (8)

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

wird die Erscheinung, dass es nur eine optimale Gasgeschwindigkeit in der Gas-Chromatographie gibt, besonders deutlich.

Für die Kapillar-Gas-Chromatographie hat JONES (9) die van DEEMTER-Gleichung variiert und noch einige zusätzliche Glieder eingeführt, die noch den Stoffaustausch von der beweglichen zur stationären Phase berücksichtigen:

$$H = \underset{A}{A} + \underset{B}{\frac{2\gamma D_G}{u}} + \underset{C}{\frac{C_1 k'}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_f^2 u}{D_F}} + \underset{D}{\frac{C_2 k'^2}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_p^2 . u}{D_G}}$$

$$+ \underset{E}{\frac{C_3 d_p^2 . u}{D_G}} + \underset{F}{\frac{2p(C_2 . C_3)^{\frac{1}{2}} k'}{1+k'} \cdot \frac{d_p . d_g . u}{D_G}}$$

H = theoretische Bodenhöhe

A = Konstante

γ = Labyrinth-Faktor

D_G, D_F = Diffusionskoeffizienten in Gas- bzw. Flüssigkeitsphase

u = lineare Gasgeschwindigkeit des Trägergases

C_1 = Massenübergangskoeffizient

k' = Produkt aus Verteilungskoeffizient k und dem Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens zu dem Gasvolumen der Trennsäule

d_f = durchschnittliche Dicke des Flüssigkeitsfilms

C_2 = Konstante

d_p = Partikeldurchmesser

C_3 = Konstante

p = Korrelationskoeffizient

d_g = Diffusionsweglänge in der Gasphase

Die ersten drei Glieder der JONES - Gleichung sind mit der van DEEMTER - Gleichung identisch.

Die graphische Darstellung der van DEEMTER - Gleichung zeigt, dass es für die bestmögliche Trennstufenhöhe nur eine optimale Durchflussgeschwindigkeit gibt, d.h. die Kurve hat ein Minimum. Glied A der van DEEMTER - Gleichung macht eine Aussage über die Streudiffusion und die Packung der Gas-Chromatographie-Säule. λ in seiner Eigenschaft als Korrekturfaktor für die Unregelmässigkeit der Lage der Säulenfüllung nimmt in der Kapillar-Säulen-Chromatographie den Wert O an und fällt somit bei der Anwendung der JONES-Gleichung für die Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie weg. γ in Glied B, der sogenannte Labyrinth-Faktor, wird gleich 1; der Partikeldurchmesser d_p und die Diffusionsweglänge d_g wird gleich dem Kapillardurchmesser. Dies entspricht aber gleich der von GOLAY (10) angegebenen und experimentell bestätigten Formel:

$$H = \frac{2D_G}{u} + \frac{2}{3}\,\frac{k'}{(1+k')^2}\cdot\frac{d^2}{D_F}\,u + \frac{1+6k'+11k'^2}{24(1+k')^2}\cdot\frac{r^2}{D_G}\,u$$

Die Voraussetzungen, unter denen die van DEEMTER-Gleichung abgeleitet worden ist, haben für alle Chromatographieprozesse, also auch für alle Arten der Flüssigkeits-Chromatographie, Gültigkeit. Es ist daher verwunderlich, dass bisher noch niemand diese allgemeinen Gesetzmässigkeiten auf die Flüssigkeits-Chromatographie übertragen hat, obgleich diese Methode schon älter als 50 Jahre ist. Wenn man bedenkt, dass in der van DEEMTER-Gleichung für optimale Betriebsbedingungen so wichtige Parameter, wie die günstigste Strömungsgeschwindigkeit der flüssigen, beweglichen Phase, enthalten sind, ist die Vernachlässigung sogar als ein schwerwiegender Fehler zu bezeichnen. Tatsächlich konnte in der gesamten Literatur über Flüssigkeits-Chromatographie nicht der geringste Hinweis gefunden werden, der wenigstens nur die Bemühung um eine Messung der Trennleistung einer Säule in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit enthalten würde. Offenbar hat man immer nur die bei der Packung einer Säule gerade mögliche, zufällige Strömungsgeschwindigkeit hingenommen.

Zur Ermittlung der zu erwartenden optimalen Strömungsgeschwindigkeiten musste deshalb zunächst rein theoretisch von der van DEEMTER-Gleichung ausgegangen werden. Die für die Flüssigkeits-Chromatographie veränderten Diffusionsbedingungen müssen vor allem in der van DEEMTER-Gleichung berücksichtigt werden, wenn eine Übertragung von der Gas- zur Flüssigkeits-Chromatographie möglich sein soll. Der wesentlichste Unterschied ist die Diffusionsgeschwindigkeit, die sich in der gasförmigen und flüssigen Phase um den Faktor 10^5 unterscheiden (11). Dadurch wird Glied B, das für den Abfall der Kurve massgeblich ist, sehr klein gegenüber der Gas-Chromatographie, während Glied C im wesentlichen unverändert bleibt. Hierdurch sollte ein breiteres Minimum als bei den entsprechenden Kurven der Gas-Chromatographie erhalten werden,

das einen grösseren Spielraum in der Wahl optimaler Betriebsbedingungen zulässt. Wesentlicher ist nun, wie relativ die optimalen Strömungsverhältnisse zwischen Gas- und Flüssigkeits-Chromatographie liegen. Während man praktisch Gas-Chromatogramme innerhalb weniger Sekunden ausgeführt hat, liegt das durchschnittliche Zeitbedürfnis bei der Flüssigkeits-Chromatographie bei minimal einer Stunde in der Dünnschicht-Chromatographie und maximal ein bis zwei Tagen bei der Papier- und Ionenaustausch-Chromatographie. Diese aus der Praxis bekannten Zeiten der Flüssigkeits-Chromatographie liegen somit etwa 1.000 bis 100.000 mal höher als bei der Gas-Chromatographie. Die obere Grenze entspricht etwa der Relation der Molekulardiffusion zwischen Gasen und Flüssigkeiten. Wenn der obere Wert daher zutreffen würde, wäre an eine Erhöhung der Geschwindigkeit in der Flüssigkeits-Chromatographie nicht zu denken.

Theoretisch kann die Frage nach dem Verhältnis der optimalen linearen Strömungsgeschwindigkeit beantwortet werden, wenn man in der van DEEMTER-Gleichung bei sonst gleichen Bedingungen und Parametern nur die verschiedene Grössenordnung der Diffusion im Glied B berücksichtigt. Da Glied A in der Kapillar-Chromatographie wegfällt, müssen lediglich B und C in die Rechnung einbezogen werden. Man erhält nun bei Annahme eines von KEULEMANS (12) berechneten Wertes von C=0,05 und B = 0,1 für die Gas-Chromatographie, sowie $B=10^{-5}$ für die Flüssigkeits-Chromatographie die folgenden relativen optimalen linearen Strömungsgeschwindigkeiten:

Flüssigkeits-Chromatographie: $u = 0{,}45 \cdot 10^{-2}$ cm/sec
Gas-Chromatographie : $u = 1{,}41$ cm/sec

Mithin unterscheiden sich die theoretisch zu erwartenden optimalen Strömungsgeschwindigkeiten bei gleichen Bedingungen hinsichtlich der anderen Parameter

lediglich um den Faktor 300. Hieraus lässt sich eindeutig folgern, dass man bisher die Flüssigkeits-Chromatographie experimentell zu langsam ausgeführt hat. Ausserdem wird erklärlich, dass die Dünnschicht-Chromatographie gemäss unseren Betrachtungen in Tabelle 1 ausserordentlich gute Trennleistungen aufweist, da hier die grössten Strömungsgeschwindigkeiten anwendbar sind. Tatsächlich liegt aber das Optimum bei noch höheren Werten. Graphisch sind die Verhältnisse in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben. Die Verbreiterung des Minimums bei der Flüssigkeits-Chromatographie wird aus den Abbildungen gut ersichtlich. Aus diesen Betrachtungen ist zu erwarten, dass es ohne weiteres möglich sein muss, die Geschwindigkeit der Flüssigkeits-Chromatographie in all ihren Anwendungsformen um einen Zeitfaktor von 100 bis 1.000 zu beschleunigen.

Das würde z.B. bedeuten, dass man nun die Chromatographie der Aminosäuren oder Zucker, für die man bisher mindestens 24 Stunden aufwenden musste, innerhalb weniger als einer Stunde durchführen könnte. Zur Diffusion hinzukommende Konvektions- oder Turbulenzströmungen könnten die Verhältnisse noch günstiger gestalten.

Allerdings erfordert die praktische Verwirklichung dieser theoretisch vorausgesagten Verhältnisse einen völlig anderen Aufbau, als man ihn sonst in der Flüssigkeits-Chromatographie verwendet.

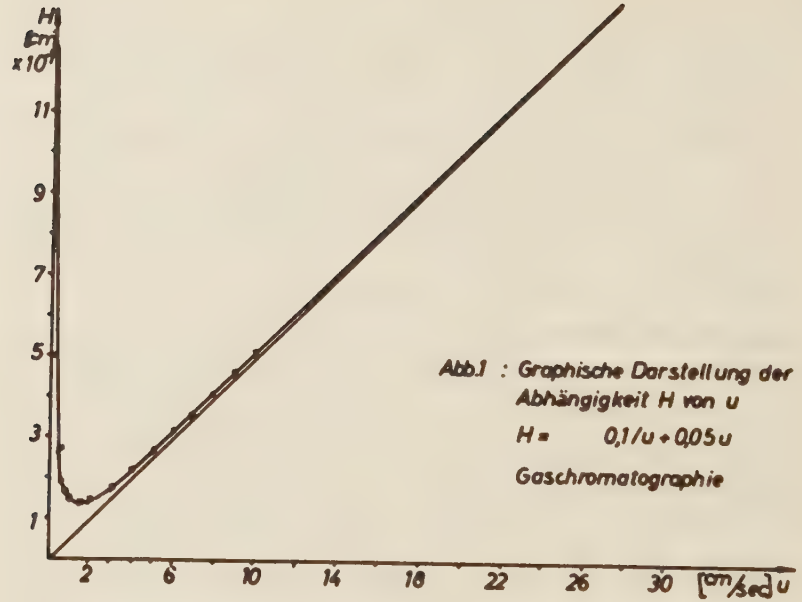


Abb.1 : Graphische Darstellung der Abhängigkeit H von u

$H = 0{,}1/u + 0{,}05\,u$

Gaschromatographie

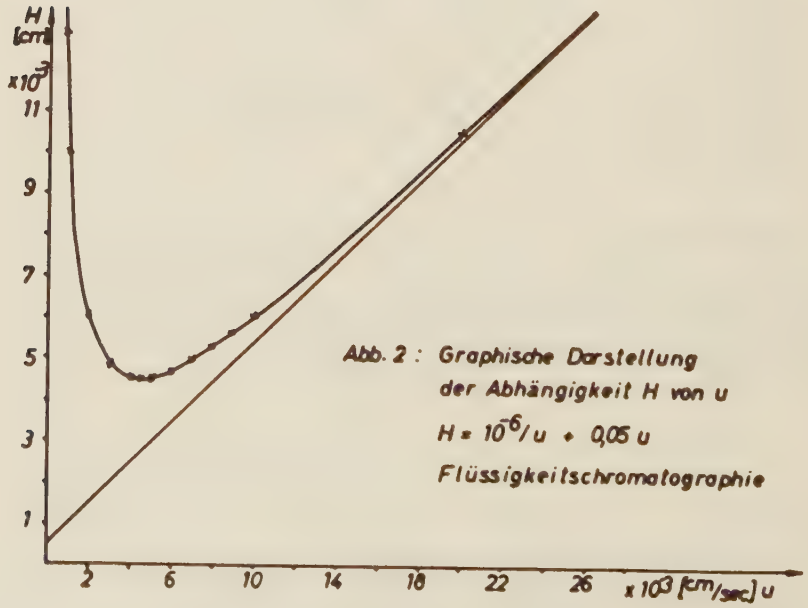


Abb. 2 : Graphische Darstellung der Abhängigkeit H von u

$H = 10^{-6}/u + 0{,}05\,u$

Flüssigkeitschromatographie

B. KAPILLAR - FLÜSSIGKEITS - CHROMATOGRAPHIE.

I. Grundgerät.

Der Aufbau des Flüssigkeits-Chromatographen erfolgte in Abweichung von der sonst für diese Methode empfohlenen Apparatur so, dass er auf Mikro-Mengen eingestellt ist und eine Injektion in die strömende flüssige, bewegliche Phase erlaubt, wie man es auch in der Gas-Chromatographie handhabt (13). Schwierige Teile waren die geeigneten Kapillar-Säulen und die Konstruktion des Einspritzblockes, worauf im einzelnen noch eingegangen werden wird.

Abbildung 3 zeigt die schematisch dargestellte Versuchsanordnung, welche bei den Untersuchungen verwendet wurde. Um eine gleichmässige Strömungsgeschwindigkeit der flüssigen, beweglichen Phase zu erhalten, wird auf die Flüssigkeit ein konstanter Gasdruck gegeben. Als Druckgas hierzu eignet sich besonders Stickstoff, da er als indifferentes Gas auch bei oxydationsempfindlichen Substanzen vorteilhaft ist. Seine in der Flüssigkeit unvermeidbare Löslichkeit ist sehr gering und ganz ähnlich der von den Edelgasen. Der "Rein"-Stickstoff, welcher aus der Stahlflasche (a) über ein zweistufiges Reduzierventil (b) kommt, wird zunächst von etwaigen feinen Staubteilchen in einem mit feinster Watte auf drei cm Länge sorgfältig gestopften Rohr (c) gereinigt. Um nun den endgültigen konstanten Stickstoffdruck, welcher im Vergleich zum Flaschendruck relativ klein ist, einstellen zu können, wird ein Feinventil (d) vor die Flüssigkeit geschaltet. Da es sich hier - im Gegensatz zur Gas-Chromatographie - nicht um die Einstellung eines gleichbleibenden Gasstromes handelt, sondern um einen konstanten Gasdruck, musste anstelle des üblichen Nadelventils ein Membranventil (d) mit nachgeschaltetem Feinmanometer (e) treten. Zur Entspan-

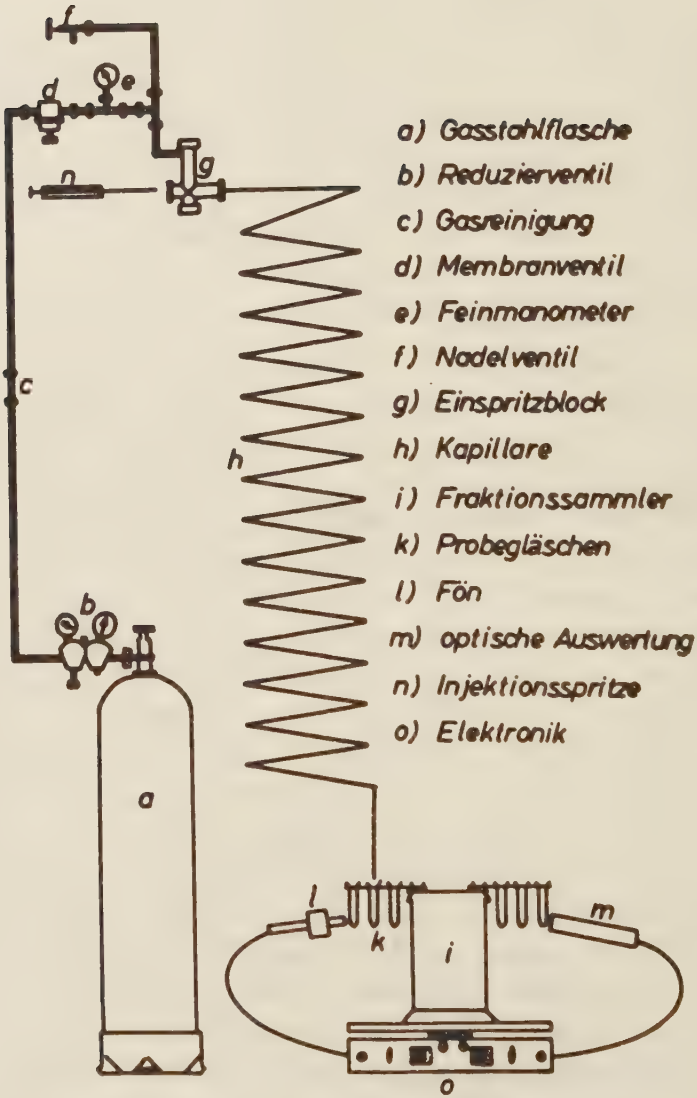


Abb.3: Aufbau des Flüssigkeitschromatographen

nung der Druckanlage beim Nachfüllen der flüssigen, beweglichen Phase wird ein Nadelventil (f) zwischen das Membranventil und den sogenannten Einspritzblock gebaut.

Dieser Einspritzblock (g) hat zwei Funktionen: er dient als Flüssigkeits-Vorratsbehälter und als Probengeber. - Seine Konstruktion und Funktion wird im Anschluss an den allgemeinen Aufbau des Flüssigkeits-Chromatographen noch gesondert beschrieben werden. - An den Einspritzblock wird nun die Kapillare(h) angeschlossen, durch welche die flüssige, bewegliche Phase zusammen mit den zu trennenden Substanzen fliesst.

An dem Gas-Chromatographen befinden sich am Ende der Trennsäule ein Detektor und der Schreiber, welcher das Analysenergebnis sofort automatisch auf Papier festhält (14). Die Konstruktion eines entsprechenden vollautomatischen Gerätes für den Flüssigkeits-Chromatographen ist äusserst erschwert wegen der schwierigen Detektion geringer Mengen gelöster Substanzen, insbesondere bei Anwendung von Lösungsmittelgemischen. Da jedoch bei der erstmaligen Erprobung dieser Flüssigkeits-Chromatographie ein vollautomatischer Detektor noch entbehrlich war, wurden hierfür keine Konstruktionsversuche im Rahmen dieser Arbeit unternommen.

Am Ende der Kapillare des Flüssigkeits-Chromatographen befindet sich daher ein Fraktionssammler(i), welcher in konstanten Zeitabständen die einzelnen Fraktionen auffängt. Dort wurde in jedes Probegläschen (k) eine bestimmte Menge Ninhydrinlösung vorgelegt, da es sich bei den Testsubstanzen um Aminosäuren handelte. Nun wird das Probegläschen nach Aufnahme des Kapillar-Eluates durch einen gezielten Warmluftstrom aus einem eigens für diesen Zweck um-

gebauten und in der Nähe befestigten Fön (h) erhitzt. Die bei Anwesenheit von Aminosäuren nun auftretende Farbreaktion kann anschliessend optisch (m) ausgewertet werden.

II. Einspritzblock.

Die besonderen Verhältnisse bei der Flüssigkeits-Chromatographie erforderten eine völlige Neuentwicklung des sogenannten Einspritzblockes. Er musste so konstruiert werden, dass ausser Kapillaren aus Metall auch solche aus Kunststoff und vor allem aus Glas angeschlossen werden konnten. Wegen der leichten Zerbrechlichkeit von Glaskapillaren galt es bei diesen, die Schwierigkeiten, welche beimAnschluss an die Apparatur entstehen, zu beheben. Eine prinzipielle Schwierigkeit ergab sich bei der Injizierung der Substanzproben. Die Belastbarkeit von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,1 bis 0,2 mm ist einerseits im Vergleich zu normalen Säulen sehr gering; andererseits soll die Substanz in Form eines kleinen kompakten "Pfröpfchens" auf einmal in die Säule einströmen können.

Die Abb. 4 des Einspritzblockes zeigt, wie diese Anforderungen erfüllt werden können. Entsprechend seiner Funktion ist der untere Teil des Blockes Probengeber. Darüber befindet sich der Vorratsbehälter (b) für die flüssige, bewegliche Phase. Mittels einer 1 µl Hamilton-Spritze (c) wird die flüssige Substanzprobe unmittelbar vor den Eingang der Kapillare (d) gegeben.

Um eine Diffusion der Substanzprobe, welche stets bei Konzentrationsunterschieden entsprechend dem Gesetz von FICK (15) entsteht, zu vermeiden, wurde um die Injektionsnadel (m) nur ein sehr kleines, freies, ringzylindrisches Volumen belassen, durch welches die

a) Gasdruck
b) Flüssigkeit
c) Hamilton - Spritze
d) Kapillare
e) Dichtungsscheibe
f) Druckring
g) Pressverschlußschraube
h) Dichtungsplatte
i) Verschlussplatte
k) Kapillarbohrung 0,6 mm
l) Kapillarbohrung 0,7 mm
m) Injektionsnadel

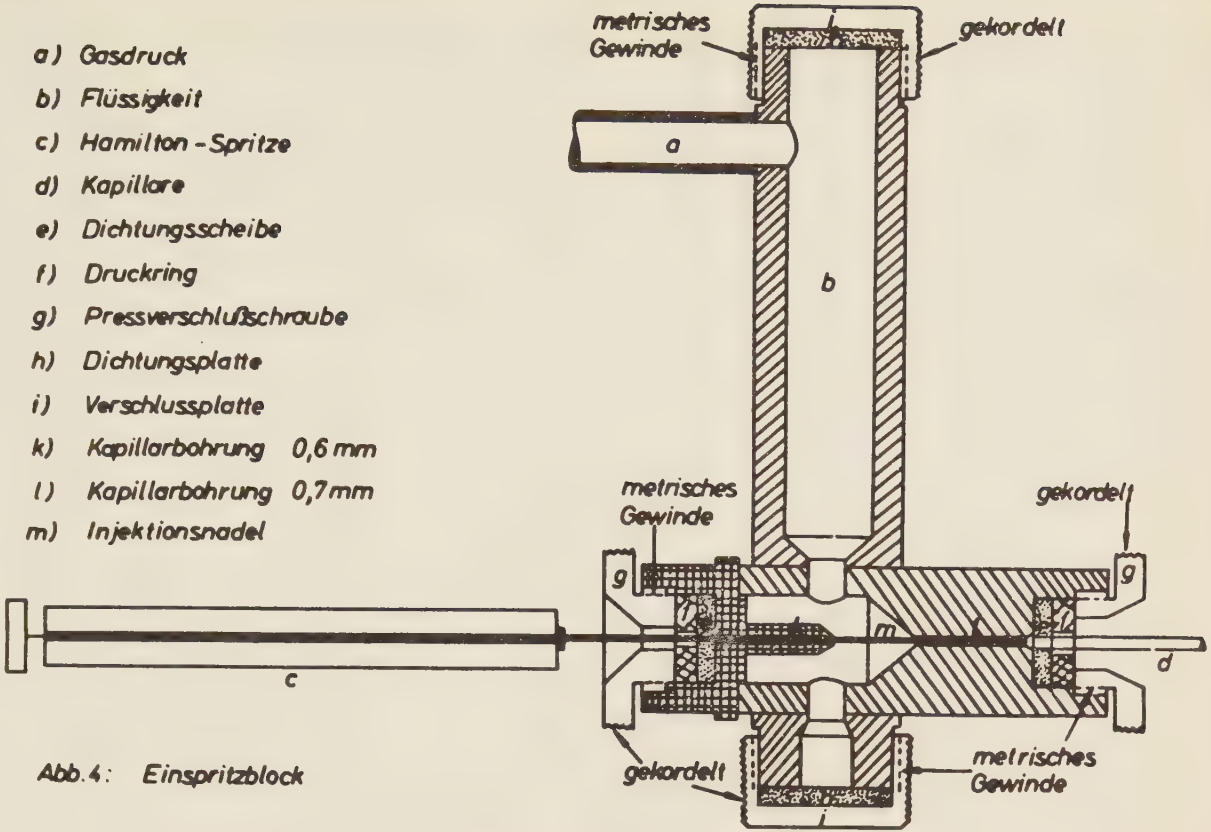


Abb. 4: Einspritzblock

flüssige, bewegliche Phase strömt. Gleichzeitig aber wird dadurch ein sehr vorteilhaftes Strömungsfeld geschaffen. Die strömende flüssige, bewegliche Phase stellt so eine sogenannte Stromröhre dar, in deren Kern, dem Stromfaden, die Substanzprobe eintritt (16). Da jedoch der Abstand zwischen dem Ende der Injektionsnadel und dem Eingang der Kapillare sehr gering gehalten wird, gelangt so die gesamte Substanzprobe als kompakter Pfropfen in die Kapillare. Dies ist, wie bereits eingangs erwähnt, eine der Grundbedingungen, welche bei der neuen Konstruktion gefordert wurden.

Da die Injizierung unter Druck beim Strömen der flüssigen, beweglichen Phase erfolgt, wird die Abdichtung der Spritzen-Einstichstelle analog der Kapillaren-Anschlussvorrichtung ausgeführt.

Der Einbau einer Kapillare erfolgt so, dass über das gerade Kapillarende (d) zunächst eine zentrierte Pressverschlussschraube (g), dann ein Druckring (f) und zum Schluss eine zentriert durchbohrte Dichtungsschraube (e) aus Silikonkautschuk geschoben wird. Anschliessend wird die Kapillare bis zum Aufsitzen im Konus in den Einspritzblock eingeführt. Nun wird die Silikonkautschukscheibe zum Abdichten nachgeschoben und mittels Druckring und Pressverschlussschraube in den Einspritzblock gepresst. Durch die Elastizität der Silikonkautschukscheibe wird gleichzeitig die Kapillare festgehalten.

Es sei abschliessend noch darauf hingewiesen, dass zur Herstellung des Einspritzblockes zwei verfügbare Materialien zur Auswahl standen: Messing und Silber. Bei der Bearbeitung mussten zwei Kapillar-Bohrungen von 0,6 (k) und 0,7 mm (l) auf eine Länge von 16 mm ausgeführt werden. Bei Messing erhält man mit den besten Bohrern noch sehr exakt diese langen, dünnen Bohrungen, während bei Silber aufgrund seiner

geringeren Härte die Tendenz zu exzentrisch aufgeweiteten Bohrungen durch das Verlaufen aus der Mittelachse sehr gross ist. Die 0,6 mm Bohrung wirkt zusammen mit der fast gleich starken Hamilton-Einspritznadel zusätzlich als Kapillarrohr-Abdichtung gegenüber der strömenden flüssigen, beweglichen Phase.

Bei Verwendung eines Messing-Einspritzblockes ist man jedoch in der Wahl der flüssigen, beweglichen Phase behindert. Z.B. tritt schon bei Zugabe von geringen Mengen Essigsäure oder Ammoniak eine Metallauflösung ein, wodurch störende Ionen in die flüssige, bewegliche Phase gelangen können. Eine nachträgliche Versilberung des Messing-Einspritzblockes gelingt aussen sehr gut; aber die wichtigen Kapillar-Bohrungen (k, l) im Innern erhalten aufgrund des Feldlinienverlaufes beim galvanischen Prozess keine Silberschicht. Demzufolge ermöglicht nur ein Silber-Einspritzblock eine Variation der Lösungen und p_H-Werte.

III. Testsubstanzen.

Die Testsubstanzen, welche in dieser Arbeit zur Erprobung der Apparatur und zur Überprüfung der theoretisch gewonnenen Erkenntnisse verwandt wurden, waren Aminosäuren. Die Konzentration der Aminosäurelösungen musste auf das maximale Einspritzvolumen von 1 µl abgestimmt werden. Für die Verwendung einer 1 µl Präzisionsspritze der Firma Clark Hamilton Precision Instruments A.G., New York, sprachen zwei Gründe: einerseits erwiesen sich die Abmessungen der Injektionsnadel bei der Konstruktion des Einspritzblockes als sehr günstig, andererseits sollte die gesamte Substanzmenge als kleiner, kurzer Pfropfen in die Kapillare gelangen.

1 µl Testlösung enthielt jeweils 10 γ einer

Aminosäure, d.h. bei einer Dreifachtrennung wurden mit einer Einspritzung von 1 µl insgesamt 30 γ Substanz in die Säule gegeben. Für eine Zweifachtrennung, wie z.B. Valin und Glycin, wurden 500 mg Valin und 500 mg Glycin in ein 50 ml-Messkölbchen eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. 1 µl dieser Lösung enthielt 10 γ Valin und 10 γ Glycin.

Es wurden im Verlauf dieser Arbeit sowohl neutrale als auch basische und saure Aminosäuren, wie sie in Tabelle 3 aufgeführt sind, verwandt, um den Einfluss der einzelnen Gruppen erkennen zu können.

Name	Molekulargewicht	10γ = µMol
DL-Alanin (DL-α-Amino-Propionsäure)	89,09	0,11
L-Cystin (α,α'-Diamino-β,β'-Di-thio-Dipropionsäure)	240,29	0,04
L-Glutaminsäure (L-α-Amino-Glutarsäure)	147,13	0,07
Glycin (Amino-Essigsäure)	75,07	0,13
L-Lysin (L-α,ε-Diamino-Capron-säure)	146,19	0,07
DL-Phenylalanin (DL-α-Amino-β-Phenyl-propionsäure)	165,19	0,06
DL-Serin (DL-α-Amino-β-Oxypro-pionsäure)	105,09	0,10
DL-Valin (DL-α-Amino-Isovaleriansäure)	117,17	0,09

Tab. 3: Chromatographierte Aminosäuren.

IV. Nachweis der getrennten Substanzen.

Die beste Nachweismethode für Aminosäuren in der Chromatographie ist die seit dem Jahre 1910 von RUHEMANN (17) entdeckte Farbreaktion von Aminosäuren mit Triketohydrindenhydrat, dem sogenannten Ninhydrin. Bei der Nachweisreaktion soll zunächst eine Dehydrierung der nachzuweisenden α-Aminosäure zur entsprechenden Iminosäure eintreten; letztere soll sodann durch Hydrolyse in einen um ein C-Atom ärmeren Aldehyd, sowie Ammoniak und Kohlendioxid zerfallen. Das so erhaltene Diketohydrindol kann sich mit dem freigesetzten Ammoniak und einem weiteren Molekül Ninhydrin zu dem blauvioletten Farbstoff Diketohydrindyliden-diketohydrindamin kondensieren. Da verschiedene Aminosäuren verschiedene Färbungen ergeben, müssen auch jeweils verschiedene Endprodukte entstehen. Allein schon Ammoniak ohne irgendeine Spur Aminosäure ergibt mit Ninhydrin eine Färbung (18). Es musste also auf völlige ammoniakfreie Lösungen bei der Flüssigkeits-Chromatographie geachtet werden, wenn das Untersuchungsergebnis vom Nachweis der Aminosäure mittels der Ninhydrin-Reaktion abhängt.

Die Reagenzlösung bestand aus 0,3 % Ninhydrin, 94,7 % n-Butanol und 5 % 2n-Essigsäure. Sie wurde in einer dunklen Schliffflasche unter Stickstoffgas aufbewahrt und jeweils erst vor Gebrauch in eine Bürette eingefüllt. Zum Abmessen der in die Probegläschen vorzulegenden Ninhydrin-Lösung hatte sich eine Mikro-Bürette nach BANG mit 1/100 Graduierung am besten bewährt, da bereits bei einem eventuellen Kontakt der Vorratslösung mit einem Kunststoffansauger die Reagenzlösung genügend reaktionsfähige Fremdsubstanz herauslösen kann und damit unbrauchbar wird. Die Erhitzung des Eluates mit minimal 0,1 bis maximal 0,2ml Ninhydrinlösung erfolgte bis zum Siedepunkt einer der

Komponenten der flüssigen, beweglichen Phase und dauerte 5 Minuten, entsprechend der vorgewählten Zeiteinheit des Fraktionssammlers.

V. Kupferkapillaren.

Zur Herstellung von Kupferkapillaren wird geeignet dimensioniertes Ausgangsrohrmaterial kalt durch sogenannte Ziehringe gezogen, nachdem es zuvor durch Glühen in einem Röhrenofen unter trockener Schutzgasatmosphäre weich gemacht worden war(19). Die bei den folgenden Untersuchungen eingesetzten Kupferkapillaren waren jeweils 10 m lang und hatten einen Innendurchmesser von 0,4 mm und einen Aussendurchmesser von 1,6 mm. Sie wurden bezogen von den Schoeller-Werken K.G. in Hellenthal / Eifel. Diese Kupferkapillaren zeichnen sich auf ihrer gesamten Länge aus durch eine sehr grosse Gleichmässigkeit des inneren Durchmessers und haben im Innern eine glatte Metalloberfläche, welche frei ist von Rillen und Rissen.

1. Imprägnierung.

Zur Imprägnierung von Trennkapillaren für die Gas-Chromatographie gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Methoden, das sogenannte "statische"(20) und das "dynamische"(21) Verfahren. In der Praxis jedoch hat sich das von DIJKSTRA und DE GOEY angegebene dynamische Verfahren am besten bewährt und ist deshalb auch bei den hier bearbeiteten Kupferkapillaren verwendet worden.

Um Verunreinigungen im Innern der Metallkapillare - wie etwa Gleitmittel aus dem Ziehprozess - entfernen zu können, wurde die Kupferkapillare mit einigen organischen Lösungsmitteln durchgespült. Hierzu wurden der Reihe nach verwendet: Chloroform, Aceton, Äther und Petroläther. Anschliessend wurde

die Kupferkapillare 36 Stunden in einem elektrisch beheizten Rohrofen unter geringem Durchfluss eines Inertgases, wie z.B. Stickstoff, auf 200° C erhitzt. Ohne die hierdurch herbeigeführte Alterung der Kupferkapillare wäre beim Gebrauch eine stetige Veränderung des Oberflächengefüges eingetreten. Durch die so gealterte Kupferkapillare wurde nun mittels einer Wasserstrahlpumpe 24 Stunden lang bei 140° C Luft hindurchgesaugt. Anschliessend wurde die so erzeugte Korrosionsschicht eine Stunde lang mit einer schwach strömenden 2n-Salzsäurelösung bei Zimmertemperatur behandelt. Nachdem die Kupferkapillare mit destilliertem Wasser neutralgewaschen war, wurde sie kurz mit Aceton durchgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Konzentration der Imprägnierlösung wurde entsprechend der gewünschten Schichtdicke des aufzutragenden Filmes gewählt. Das Arbeiten mit Imprägnierlösungen von geringer Konzentration ist nicht zu empfehlen, da aufgrund der Kenntnisse über das Oberflächengefüge und die Oberflächenspannung in Metallkapillaren sehr oft Filme mit keiner konstanten Schichtdicke entstehen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich unbenetzte Stellen innerhalb der Kapillaroberfläche ausbilden können, steigt mit Abnahme der Filmdicke, wie auch HALÁSZ und SCHREYER (22) in ihren Arbeiten festgestellt haben.

Die vorbehandelte Kupferkapillare wurde mit einer 20 %igen Lösung von Polyäthylenglykol 4000 in Chloroform bearbeitet. Der Lösungspfropfen wurde mittels eines zeitlich konstanten Stickstoffstromes durch die Kupferkapillare gedrückt. Zur Einstellung des volumenmässig geringen, aber gleichbleibenden Gasmengenstromes diente ein von MACK (23) beschriebenes Präzisionsnadelventil. Durch dieses erst lässt

sich eine konstante Pfropfenwanderungsgeschwindigkeit und damit eine gleichmässige Filmdicke erreichen. Diese entstehende Filmdicke ist direkt proportional der Wanderungsgeschwindigkeit und der Konzentration der Imprägnierlösung, aber umgekehrt proportional dem Kapillarenquerschnitt (24).

An das Ende der zu imprägnierenden Kupferkapillare wurde eine durchsichtige Kunststoffkapillare angeschlossen, welche nahezu den gleichen Innendurchmesser wie die Metallkapillare hatte. Durch Messung des zeitlich zurückgelegten Weges eines Vergleichs-Lösungspfropfens in der Kunststoffkapillare konnte man den Gasmengenstrom am Präzisionsnadelventil genau einregulieren. Bei zu schneller Imprägnierung besteht jedoch die Gefahr, dass der entstehende Film abreisst und sich statt dessen auf der Kapillaroberfläche Tröpfchen bilden. Nachdem die Imprägnierlösung mit etwa 5 cm/sec durch die Metallkapillare gedrückt worden war, wurde die Kapillare noch zwei bis drei Stunden bei gleichem Gasmengenstrom durchgespült, um so das verbliebene Lösungsmittel herauszuholen. Anschliessend wurde die Kupferkapillare mit einer kleinen Heizrate bis 160° C unter Beibehaltung des Gasstromes aufgeheizt. Nach etwa 12 bis 15 Stunden war eine ausreichende Alterung der mit Polyäthylenglykol 4000 bestehenden Imprägnierschicht erreicht und somit die Trennsäule einsatzfähig. Beide Enden der Kupferkapillare, sowohl das für den Anschluss im Einspritzblock, als auch jenes freie Kapillarende über dem Fraktionssammler, wurden vor dem endgültigen Einbau mittels einer feinen Feile geglättet und mit einem Pfriemen nachbearbeitet.

2. Phasenuntersuchungen.

Bei den folgenden Untersuchungen mit Kupferkapillaren wurden jeweils 0,2 ml der oben bereits beschriebenen Ninhydrin-Reagenzlösung in den Probegläschen vorgelegt. Zur Bestimmung der Durchbruchszeit, jener Zeit, die eine nicht zurückgehaltene Substanz zum Durchströmen der Trennkapillare benötigt, diente eine injizierte Stickstoffblase.

Die flüssige, bewegliche Phase bestand aus einem Äthanol/Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 7:3, welchem in den einzelnen Untersuchungsreihen jeweils ein bestimmter Prozentsatz Polyäthylenglykol 4000 zugesetzt wurde. Es zeigte sich, dass die gleiche Aminosäure bei verschiedenem Gehalt an Polyäthylenglykol 4000 jeweils verschieden lang in der Kupferkapillare zurückgehalten wurde.

CONSDEN und Mitarbeiter (25) haben zur mathematischen Beschreibung der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten den Verzögerungsfaktor R_F eingeführt. Der R_F-Wert stellt ein Fortbewegungsverhältnis zwischen einer zurückgehaltenen und einer nicht zurückgehaltenen Substanz dar. Der Zahlenwert für eine Substanz ist kleiner als 1. Bei der Flüssigkeits-Chromatographie kann man zur Berechnung folgende Kenngrössen messen: Zeit, Volumen oder Anzahl der Fraktionen.

$$R_F = \frac{\text{Wanderungsgeschwindigkeit der Substanz}}{\text{Wanderungsgeschw. der flüss.,bew.Phase}}$$

In der Abbildung 5 sind als Beispiel für den Einfluss der Konzentration an Polyäthylenglykol 4000 in der flüssigen, beweglichen Phase Äthanol/Wasser (7:3) die R_F-Werte für Valin aufgetragen.

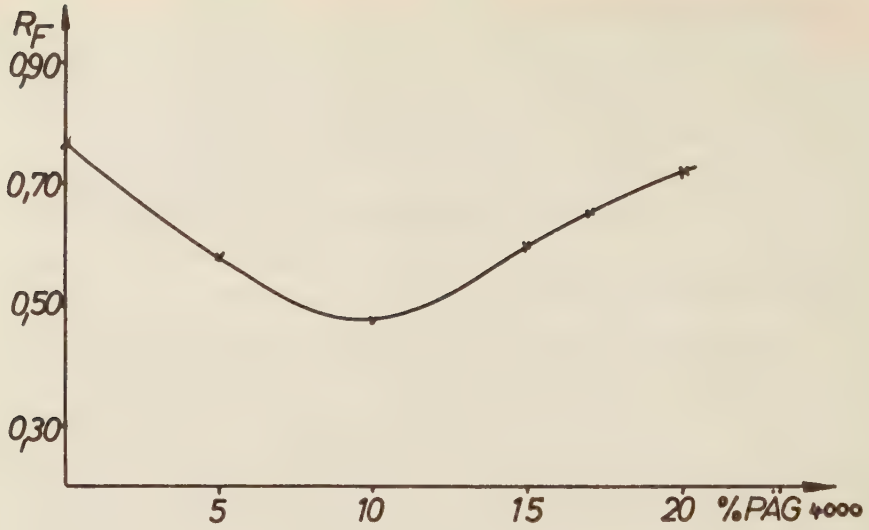


Abb. 5: Abhängigkeit zwischen R_F-Wert und Gehalt an Polyäthylenglykol 4000.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/ Wasser im Volumenverhältnis 7:3.
Aminosäure: DL-Valin

Der Verlauf der Kurve lässt erkennen, dass bei niederem Polyäthylenglykol 4000-Gehalt eine Adsorptions-Chromatographie vorliegt. Es findet jedoch ein Übergang von der Adsorption an der aktiven Kapillareninnenfläche zu einer Verteilungs-Chromatographie statt, wie am Minimum der Kurve zu erkennen ist.

Die bei der Adsorptions-Chromatographie meistens auftretenden "tailing-effects" (Schwanzbildungen) waren im vorliegenden Falle nicht vorhanden. Eine Verschleppung von Substanzbanden, in Form unsymmetrischer Banden erkenntlich, ist eine Folge der verschmierten Zonenrückfronten, da die Adsorptionsisotherme gegen die Sättigungskonzentration hingekrümmt

ist. Dabei wird die zurückbleibende Substanzmenge infolge ihrer geringen Konzentration verhältnismässig stärker adsorbiert als die vorangehende. Bei der Verteilungs-Chromatographie sind "tails" theoretisch nicht möglich, da die Isotherme über einen sehr grossen Konzentrationsbereich hin linear verläuft.

Das Ausbleiben der "tails" bei unseren Versuchen ist auf die gealterte Imprägnierschicht von Polyäthylenglykol 4000 in der Kupferkapillare zurückzuführen.

Eine andere Erscheinung der Verteilungs-Chromatographie zeigt das in Abbildung 6 dargestellte Chromatogramm.

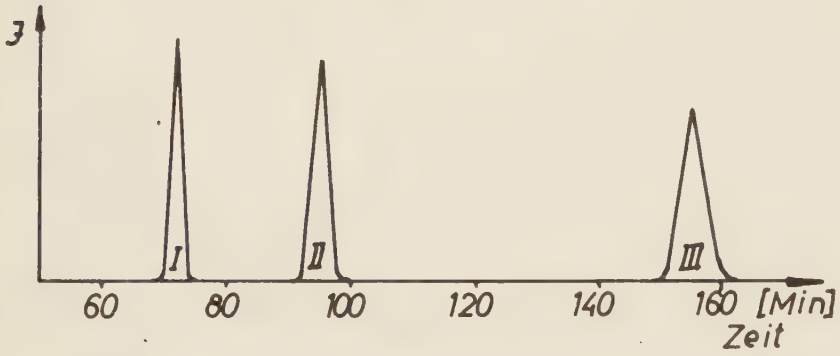


Abb. 6: Bandenverbreiterung.
Kupferkapillare 10 m x 0,04 mm
Flüssige, bewegliche Phase: 17 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3).
Aminosäuren: I Phenylalanin
II Valin
III Glycin

Mit zunehmender Bödenzahl findet eine Bandenverbreiterung statt, da beim effektiven Stoffaustausch zwischen 2 Phasen unterschiedliche Verweilzeiten auftreten. Die glockenförmigen Banden entsprechen annähernd einer GAUSSschen Verteilungskurve (26).

Substanz	Strukturformel	Anzahl der C-Atome	Molekular-gewicht	R_F-Wert	
DL-Phenylalanin	$C_6H_5.CH_2.CH(NH_2).COOH$	9	165,19	0,86	1)
DL-Valin	$(CH_3)_2.CH.CH(NH_2).COOH$	5	117,15	0,65	2)
DL-Alanin	$CH_3.CH(NH_2).COOH$	3	89,09	0,57	3)
Glycin	$H_2N.CH_2.COOH$	2	75,07	0,49	4)
DL-Serin	$HO.CH_2.CH(NH_2).COOH$	3	105,09	0,47	5)
L-Glutaminsäure	$HOOC.(CH_2)_2.CH(NH_2).COOH$	5	147,13	0,40	6)
L-Lysin	$H_2N.(CH_2)_4.CH(NH_2).COOH$	6	146,19	0,27	7)

Tab. 4: R_F-Werte von Aminosäuren in Kupferkapillaren. Flüssige, bewegliche Phase: 17 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3).

In der vorausgehenden Tabelle 4 sind die R_F-Werte von α-Aminosäuren aufgeführt, welche bei Messungen mit der flüssigen, beweglichen Phase Äthanol/Wasser und einem 17 %igen Gehalt an Polyäthylenglykol 4000 erhalten wurden. Man erkennt, dass mit steigender Kohlenstoffzahl sich die R_F-Werte in einer homologen Reihe erhöhen. Polare Gruppen im Molekül jedoch setzen den R_F-Wert herab. Die basische Aminosäure Lysin mit der Kohlenstoffzahl 6 hat einen äusserst niedrigen R_F-Wert. In Abbildung 7 ist die Beziehung zwischen dem R_F-Wert der einzelnen Aminosäuren und der Kohlenstoffzahl graphisch dargestellt.

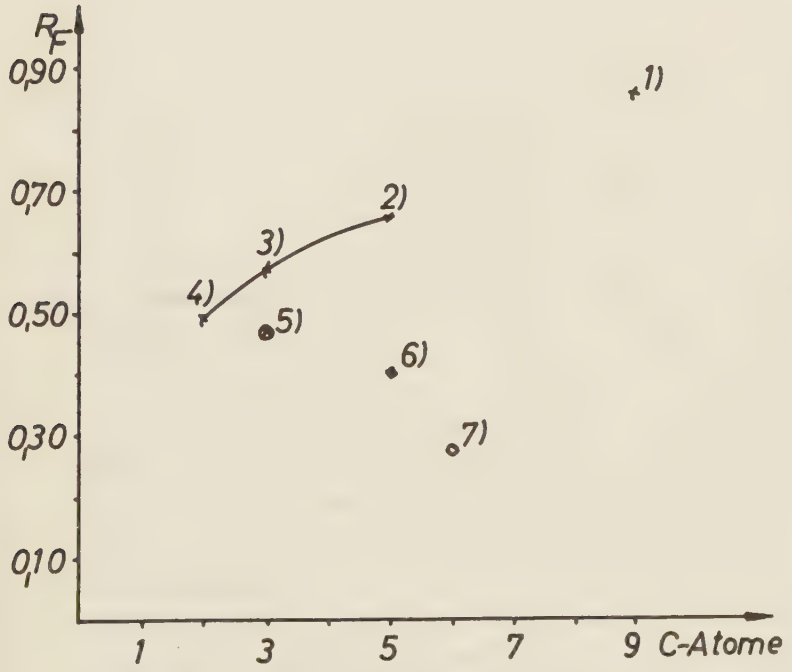


Abb. 7: Beziehung zwischen R_F-Wert und Kohlenstoffzahl. Flüssige, bewegliche Phase: 17% Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3). Werte der Tab. 4.

In Abbildung 8 sind die mit einer flüssigen, beweglichen Phase von 17 % Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser an einer Kupferkapillare untersuchten Aminosäuren aufgezeigt.

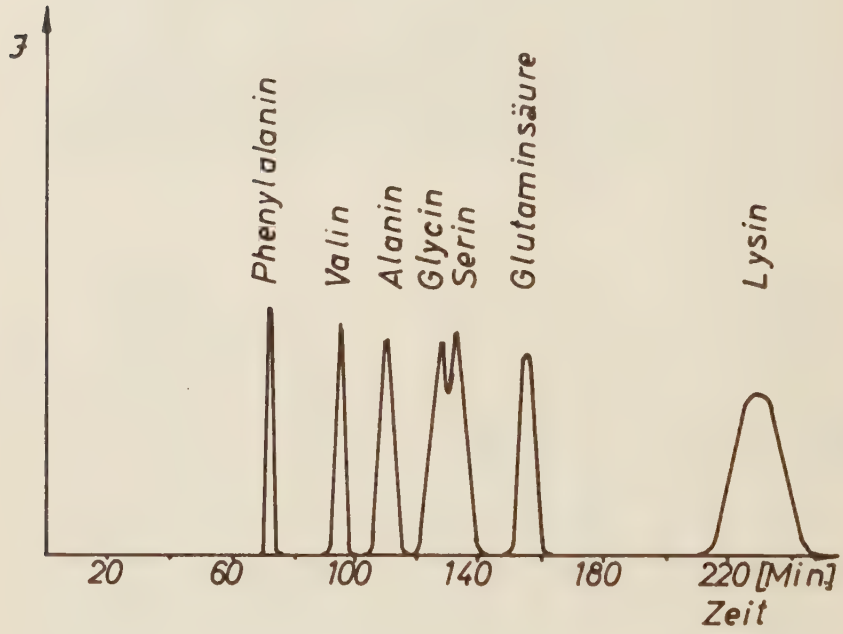


Abb. 8: Flüssige, bewegliche Phase: 17 % Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser (7:3).
10 m Kupfersäule, Innendurchmesser 0,4 mm,
Druck 0,9 atü, Durchbruchszeit 62 Min..

Die Messungen bei einer flüssigen, beweglichen Phase, welche 20 % Polyäthylenglykol 4000 und mehr enthielt, wurden durch das sich ständig in der Kapillare ausscheidende Polyäthylenglykol 4000 sehr erschwert. Der gemessene R_F-Wert für Valin bei 20 % Polyäthylenglykol 4000 betrug 0,72 und ist in Abb. 5

mitaufgenommen worden.

Wenn bei einer Kupferkapillare die Tropfenzeit, das ist die Zeit, welche verstreicht zwischen dem Abfallen zweier Tropfen in ein Eluatgläschen, bei konstantem Gasdruck steigt, so findet eine Ausscheidung von Polyäthylenglykol 4000 innerhalb der Kupferkapillare statt. Verstopfte Kupferkapillaren wurden durch Hitze bei gleichzeitigem Druck wieder geöffnet. Vor Benützung mit neuer Polyäthylenglykol 4000 enthaltender flüssiger, beweglicher Phase wurde die Kapillare mit reinem Äthanol/Wasser-Gemisch zur Reinigung durchgespült.

VI. Aluminiumkapillaren.

Aluminiumkapillaren können wie Kupferkapillaren von den Schoeller-Werken bezogen werden. Aluminium reagiert sehr rasch mit Sauerstoff der Luft unter Bildung eines dünnen Oxidhäutchens, welches das darunter liegende Metall vor weiterem Angriff schützt. Es wurde versucht, auf der Kapillareninnenfläche eine aktive Oxidschicht herzustellen.

Bereits in der Gas-Chromatographie sind solche Versuche durchgeführt worden. PETITJEAN und LEFTAULT (27) beschreiben Aluminium-Kapillar-Säulen, welche für ihre gaschromatographischen Versuche eine genügend aktive γ-Aluminiumoxid-Innenschicht trugen. Das Herstellungsverfahren wurde jedoch noch nicht mitgeteilt, da die ALCOA RESEARCH LABORATORIES sich die Veröffentlichung bis zum Abschluss der Patentrechtsfragen vorbehalten wöllen. Obige Referenten geben lediglich an, dass ihre Oxidschichten eine Stärke von etwa 5×10^4 Å hatten.

Das in der Technik angewandte "Eloxal-Verfahren" erzeugt durch anodische Oxydation eine viermal stärkere Oxidschicht (0,02 mm) als die ALCOA RESEARCH

LABORATORIES erhalten konnten. Jedoch ist dieses elektrische Verfahren aufgrund des Feldlinienverlaufes bei den Aluminiumkapillaren nicht anwendbar, da man lediglich auf der Kapillarenaussenseite eine solch dicke Oxidschicht erzeugen kann.

1. Imprägnierung.

Die bei den Untersuchungen in dieser Arbeit verwandten Aluminiumkapillaren hatten einen Innendurchmesser von 0,1 bis 0,3 mm. Nach der Vorschrift von FERNANDEZ-LADRELA (28) , welcher Aluminiumdrähte von 1 mm Durchmesser und weniger bearbeitete, wurde eine Korrosionslösung folgender Zusammensetzung hergestellt: in einem 1 Ltr.-Messzylinder wurden 125 g Na_2CO_3, 8 g Na_2CrO_4 und 25 ml konz. NH_4OH mit Wasser zu einem Liter ergänzt. 10 Minuten lang wurde bei einer Temperatur von 50 bis 60° C ein Teil dieser Lösung durch die Aluminiumkapillare gedrückt und anschliessend mit Stickstoffgas 12 Stunden bei 200° C durchgespült. Alsdann wurden durch die erkaltete Aluminiumkapillare der Reihe nach folgende absolute Lösungsmittel geleitet: Äther, Petroläther, Methanol und Äthanol. Dabei wurde zwischen jedem Lösungsmittelspülgang 10 bis 20 Minuten die Kapillare im Rohrofen auf 200° C erhitzt. Hernach war die Aluminiumkapillare mit Äthanol/Wasser einsatzfähig. Manche Vorschriften verlangen nach der Behandlung mit obiger Korrosionslösung einen Spülgang mit Kalilauge und Wasser. Bei diesen Aluminiumkapillarversuchen aber darf nach der Anätzung keine sofortige Kalilauge- oder Wasserbehandlung stattfinden, da sonst die Aluminiumkapillare sofort verstopft.

Ein zweites Verfahren beruht auf der Kenntnis, dass mit Quecksilber-II-chloridlösung das Aluminiur amalgamiert. Unter Luftfeuchtigkeit schiessen aus solch einem amalgamierten Aluminium in kurzer Zeit

weisse Fasern von Aluminiumoxidhydrat empor, d.h. Wasser wird von einem derartig aktivierten Aluminium zersetzt.

Es wurde deshalb eine 0,1 %ige $HgCl_2$-Lösung in absolutem Methanol hergestellt. 20 ml dieser Lösung wurden während 9 Minuten durch die Aluminiumkapillare gedrückt, welche anschliessend unter trockenem Stickstoffgas auf 300° C aufgeheizt wurde. Nach 10 Stunden wurde das Stickstoffgas progressiv mit Wasser befeuchtet und die Aluminiumkapillare so weitere 18 Stunden bei 350° C durchgespült. Auf diese Weise sollte abgelagertes Quecksilber aus der Aluminiumkapillare herausgeholt werden. Dieser Versuch gelang jedoch nicht vollständig, da während des Einsatzes der Aluminiumkapillare mit Äthanol/Wasser stets eine kleine Menge Wasserstoffgas herausgespült wurde und die Durchflussmenge an flüssiger, beweglicher Phase bei konstantem Gasdruck sich allmählich verringerte. Aber kurzfristige Nachbehandlung mit Stickstoffgas bei 350 bis 500° C machte die Aluminiumkapillare immer wieder einsatzfähig.

Eine Behandlung einer neuen Aluminiumkapillare mit Sauerstoff bei 90° C während 65 Stunden erbrachte wegen der schnellen Passivierung des Aluminiums keine brauchbare Oxidschicht. Mehrfache Versuche zur Herstellung einer guten Aluminiumoxidschicht über Aluminiumchlorid und dessen anschliessender Hydrolyse blieben ohne brauchbare Ergebnisse. Bei all diesen Versuchen musste die Tatsache beachtet werden, dass Aluminiumoxid bei 2050° C erweicht, während das Aluminium selbst schon bei 660° C schmilzt. Somit war eine Bearbeitung der Aluminiumkapillaren bei höherer Temperatur unmöglich.

2. Phasenuntersuchungen.

Entsprechend den Versuchen in der Reihe der Kupferkapillaren wurde auch hier die flüssige, bewegliche Phase 17 % Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser im Volumenverhältnis 7:3 eingesetzt. Die hier bei dieser Testreihe erhaltenen R_F-Werte der Tabelle 5 sind in Abbildung 9 graphisch aufgetragen; es zeigt sich, dass nicht nur bei der Kupferkapillare, sondern auch bei der Aluminiumkapillare ein Übergang von der Flüssigkeits-Adsorptions-Chromatographie (LSC = liquid-solid-chromatography) zur Flüssigkeits-Verteilungs-Chromatographie (LLC = liquid-liquid-chromatography) vorliegt.

Substanz	R_F-Wert	
DL-Phenylalanin	0,79	1)
DL-Valin	0,61	2)
DL-Alanin	0,55	3)
Glycin	0,47	4)
L-Glutaminsäure	0,38	5)

Tab. 5: R_F-Werte von Aminosäuren in Aluminiumkapillaren.
Flüssige, bewegliche Phase: 17 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3)

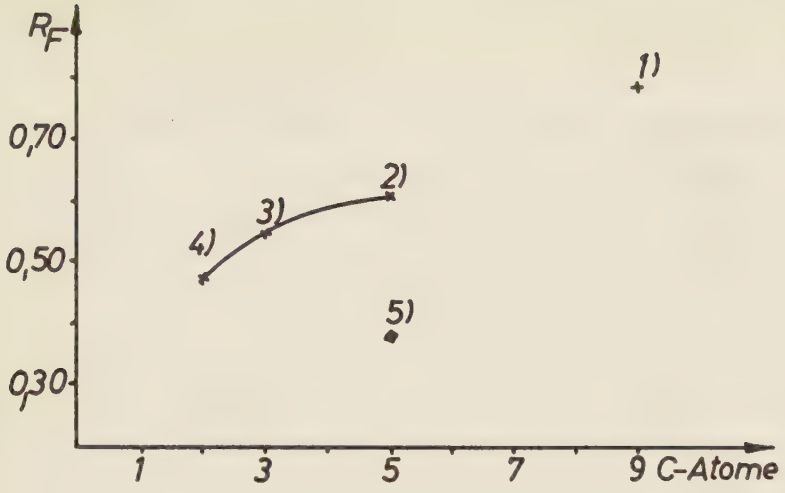


Abb. 9: Beziehung zwischen R_F-Wert und Kohlenstoffzahl.
Flüssige, bewegliche Phase: 17 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3).
Werte der Tab. 5.

Bei der Trennung von Aminosäuren mittels der Aluminiumkapillare wurde beobachtet, dass die effektive Belastbarkeit der Säule geringer ist als die der Kupferkapillare. Dies wurde besonders sichtbar bei Benützung der flüssigen, beweglichen Phase Äthanol/Wasser im Volumenverhältnis 7:3 ohne jeglichen Zusatz von Polyäthylenglykol 4000. Die Tabelle 6 veranschaulicht die erhaltenen R_F-Werte, welche in Abbildung 10 aufgezeigt sind.

Substanz	R_F-Wert	
DL-Valin	0,56	1)
DL-Alanin	0,49	2)
Glycin	0,45	3)

Tab. 6: R_F-Werte von Aminosäuren in Aluminiumkapillaren.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3).

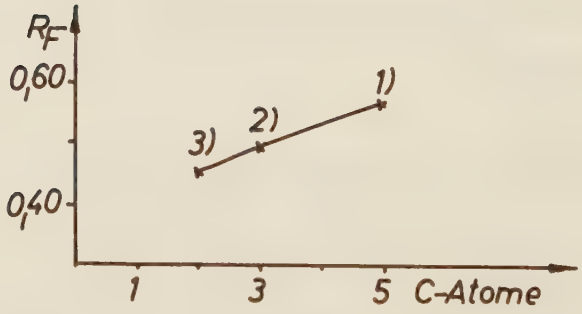


Abb. 10: Beziehung zwischen R_F-Wert und Kohlenstoffzahl.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3). Werte der Tab. 6.

VII. Glaskapillaren.

1. Glaskapillaren ohne Füllkörper.

Die Glaskapillaren besitzen eine ausgezeichnete Formbeständigkeit; jedoch ist ihre leichte Zerbrechlichkeit ein nicht zu übersehender Nachteil, welcher sich beim Anschluss an den Einspritzblock besonders bemerkbar macht. Diese Unannehmlichkeit wird jedoch kompensiert von der guten Benetzungseigenschaft sowohl gegenüber polaren als auch unpolaren Flüssigkeiten und von der Gleichmässigkeit der inneren Dimensionen; denn eine einzige Verengung innerhalb der Glaskapillare erzeugt einen solchen Druckabfall, wie er bei einer gleich engen Glaskapillare über die gesamte Länge auftritt.

a. Glasziehmaschine.

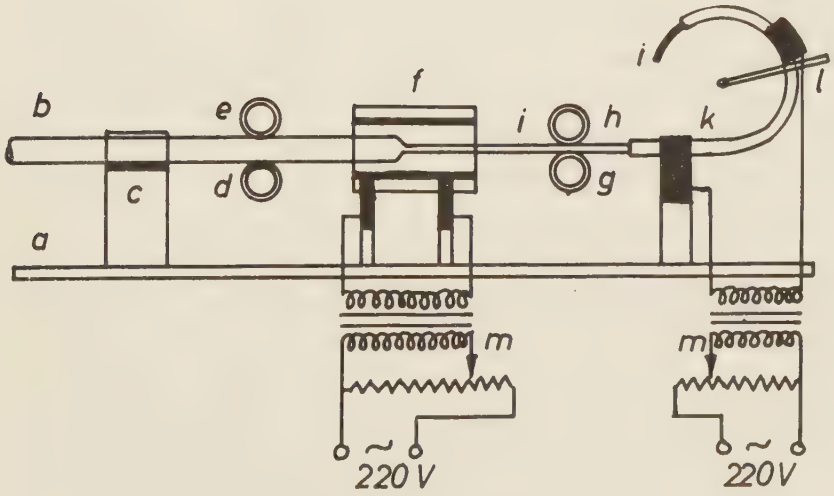


Abb. 11: Glasziehmaschine.

Zur Herstellung von Glaskapillaren wurden von DESTY und Mitarbeitern (29), wie auch von KREYENBUHL (30) eine Apparatur entwickelt, mit der auf sehr einfache Weise solche exakten Glaskapillaren in beliebiger Länge und verschiedenen Innendimensionen in Form von spiralförmigen Ringen hergestellt werden können. Für unsere speziellen Anforderungen ist eine variierte Apparatur zum vollautomatischen Ziehen von Glaskapillaren aufgebaut worden.

Im Folgenden sollen an Hand der vorausgehenden Abbildung 11 diese Maschine kurz beschrieben und einige Erfahrungen mitgeteilt werden. Der Aufbau der einzelnen Teile erfolgte in fester Montage auf einer Grundplatte (a). Zwei übereinander senkrecht stehende Räder (d,e) schieben die auf einem Ständer (c) lose liegende, dickwandige Ausgangsglaskapillare (b) in den Erweichungs- und Ziehofen (f). Von dort ziehen die ebenfalls übereinander senkrecht stehenden Räder (g,h) die neue dünne Glaskapillare (i) heraus, um sie in ein beheiztes Rohr (k) zu drücken, dessen Ende einen halbkreisförmigen Bogen bildet. Auf einer senkrecht zur Rohrbogenfläche horizontal angebrachten Führungsstange (l) wird die spiralförmige Glaskapillare gespeichert.

Um eine gute Haftfestigkeit für das Glas zu erzielen, wurden die beiden Räderpaare (d,e;g,h) mit einem elastischen Überzug versehen, in welchen alsdann Führungsrillen eingefrässt wurden. Dieser elastische Überzug auf den Rädern bestand nicht aus Gummi, sondern aus einem Zweikomponenten-Kunstharz der Firma Paul Lechler, Kunststoff-Chemie, G.m.b.H., Urach/Württ.. Diese Kunststoffmasse mit dem Handelsnamen "Elastomasse KC 401" besitzt metallklebende Eigenschaften, eine gute Kerb- und Temperaturbeständigkeit und ist von hoher Elastizität. Ausserdem

kann sie spanabhebend bearbeitet werden und ist in einfacher Weise auf den Rädern anzubringen. Demgegenüber erfordert das Überziehen mit Gummi durch Heissvulkanisation oder durch ein sonstiges Verfahren einen erheblich grösseren Aufwand, ohne bessere Eigenschaften zu erbringen. Das einfache Aufspannen von Gummiringen hat sich nicht bewährt, da der Gummi unter der dauernden Verformung schnell rissig wurde.

Die Kräfteübertragung auf die Schub- und Ziehräder erfolgte mit zwei stufenlos regelbaren Gleichstromnebenschlussmotoren über ein dazwischen geschaltetes Untersetzungsgetriebe. Die Drehzahl bleibt während einer Einstellung konstant. Die Anpressrollen der Schub- und Ziehräder wurden federnd gelagert, um insbesondere bei nicht genauer Masshaltung der Ausgangskapillare einen stets gleichen Anpressdruck zu gewährleisten.

Der Erweichungs- und Ziehofen besteht aussen aus einem Ergan-Rohr, ein keramischer Werkstoff, welches ein V4A-Rohr umschliesst. Dieses wird direkt über einen Regeltransformator mittels Niederspannungswechselstrom geheizt. Es bildet sich eine eng begrenzte Heizzone aus, und im übrigen Rohr kann eine gleichmässige Abkühlung der gezogenen Glaskapillare erfolgen. Für das wie der Ofen direkt beheizte gebogene Rohr hat sich ebenfalls V4A-Stahl am besten bewährt, da er zunderbeständig ist und ein gutes Hindurchgleiten der Glaskapillare gewährleistet. Bei der Verwendung anderer Metallsorten für die Rohre tritt oftmals eine Störung durch Festkleben der Glaskapillare ein. Die parallel zu dem Antrieb der Ziehräder geschaltete, sich drehende Führungsstange befindet sich im Mittelpunkt der Bogenfläche und kann so die aus dem Rohr aufgrund der Abkühlung spiralförmig austretende Glaskapillare als Wendel speichern.

Zum Anschluss an den Einspritzblock, so wie am Ende über dem Fraktionssammler, sind gerade Kapillarstücke mit glattem Schliff erforderlich; es muss eine erneute Aufrollung zur gestreckten Kapillare auf einer Länge von etwa 50 bis 80 mm erfolgen. Sehr einfach und mit gutem Ergebnis gelingt dies mittels einer kleinen Sparflamme. Es kann aber auch ein beheiztes V4A-Rohr benutzt werden, wodurch eine Wiedererweichung der Glaskapillare möglich ist. Auf alle Fälle muss aber bei dieser Operation eine Verengung des Innenquerschnitts vermieden werden.

b. Imprägnierung.

Bei ihren adsorptions-chromatographischen Untersuchungen mit Wasserstoffisotopen haben MOHNKE und SAFFERT (31) in der Kapillar-Gas-Chromatographie Glaskapillaren verwandt, deren innere Oberfläche mit Alkalien behandelt worden war. Entsprechend wurden nun auch für die Untersuchungen der Flüssigkeits-Chromatographie die Glaskapillaren bearbeitet.

Eine Glaskapillare wurde mit einer 17 bis 20 %igen wässrigen Ammoniaklösung gefüllt. Anschliessend wurde sie, nachdem ihre beiden Enden zugeschmolzen worden waren, in einem Rohrofen auf 170 bis 190° C erhitzt. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass mindestens 10 % des Säulenvolumens frei belassen werden und nicht mit Lösung gefüllt sind, da sonst sehr leicht die Glaskapillare beim Erhitzen infolge des auftretenden grossen Innendruckes gesprengt wird. Nach 70 Stunden wurde das Agens aus der Glaskapillare herausgedrückt, diese mit Alkohol und Stickstoffgas durchgespült und anschliessend nochmals im Rohrofen zur vollkommenen Trocknung erhitzt. Zur Kontrolle wurde ein Glaskapillarenschnitt unter dem Mikroskop bei Durchlicht und einer ent-

sprechenden Vergrösserung im Hinblick auf die Stärke der Ätzung überprüft. Bei einer guten Korrosion der Innenwand ist die SiO_2-Schicht gut zu erkennen.

c. Phasenuntersuchungen.

Es wurde zunächst bei den angeätzten Glaskapillaren als flüssige, bewegliche Phase ein Äthanol/Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 7:3 verwandt. Hierbei zeigte sich, dass bei mehrfachem Gebrauch der Säule eine zunehmende Inaktivierung eintritt und das Retentionsvolumen der Glaskapillare gegen 0 strebt. Eine Reaktivierung der Kapillarenoberfläche liess sich jeweils durch 12 bis 15stündiges Durchleiten von 10 %iger Kalilauge bei Zimmertemperatur mit anschliessendem Neutralwaschen erreichen. Die mit den Komponenten Äthanol und Wasser gebildete flüssige, bewegliche Phase ergab R_F-Werte, welche in der Tabelle 7 aufgeführt und in der Abbildung 12 graphisch aufgetragen sind.

Substanz	C-Atome	R_F-Wert DC	R_F-Wert FC
DL-Phenylalanin	9	0,63	0,66 1)
DL-Valin	5	0,55	0,58 2)
DL-Alanin	3	0,47	0,53 3)
Glycin	2	0,43	0,50 4)

Tab. 7: Vergleich der Retentionswerte von der Dünnschicht-Chromatographie und der Flüssigkeits-Chromatographie.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3).

Diese R_F-Werte gleichen weitgehend denen, welche man in der Dünnschicht-Chromatographie erhält.

Innerhalb der homologen Reihe der Monoamino-monocarbonsäuren steigen die R_F-Werte mit zunehmender Kohlenstoffzahl an, wie die Abbildung 12 zeigt.

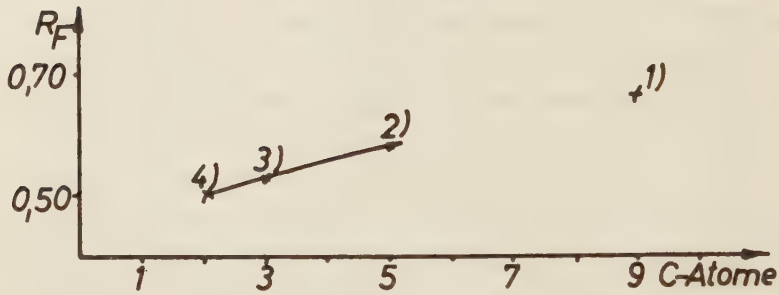


Abb. 12: Abhängigkeit der R_F-Werte von der Molekülgrösse bei homologen Aminosäuren.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3). Werte der Tab. 7.

In einer weiteren Versuchsreihe diente die Lösungsmittelkombination Benzylalkohol/Wasser/Pyridin im Volumenverhältnis 94:5:1 als flüssige, bewegliche Phase. Entsprechend der eluotropen Reihe sind bei dieser Solvenzienzusammensetzung geringere R_F-Werte als bei dem oben beschriebenen Äthanol/Wasser-Gemisch erhalten worden.

In Abbildung 13 sind die erhaltenen R_F-Werte der Tabelle 8 mit zunehmendem Kohlenstoffgerüst der Aminosäure aufgezeigt.

Substanz	C-Atome	R_F-Wert	
DL-Phenylalanin	9	0,27	1)
DL-Valin	5	0,13	2)
DL-Alanin	3	0,11	3)
Glycin	2	0,10	4)

Tab. 8: Flüssige, bewegliche Phase: Benzylalkohol/ Wasser/Pyridin (94:5:1).

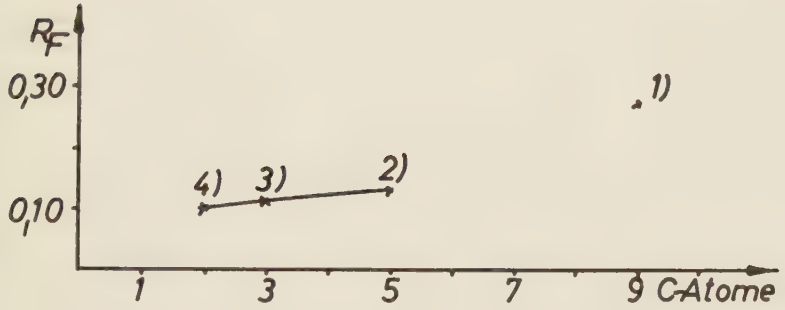


Abb. 13: Beziehung zwischen R_F-Wert und Molekülgrösse bei homologen Aminosäuren. Flüssige, bewegliche Phase: Benzylalkohol/ Wasser/Pyridin (94:5:1). Werte der Tab. 8.

Ein Austausch von Pyridin gegen Essigsäure erbrachte nur eine geringfügige Erhöhung der R_F-Werte, welche bei dem Gemisch Benzylalkohol/Wasser/Pyridin (94:5:1) gemessen wurden.

Bei dem Arbeiten mit Glaskapillaren wurde nicht nur die leichte Zerbrechlichkeit des Glases des öfteren sehr augenscheinlich, sondern auch die enorm grosse Störanfälligkeit enger Kapillaren gegen jegliche Partikelverunreinigungen der flüssigen, beweglichen Phasen. Wie bereits eingangs schon erwähnt, wurde aus diesem Grunde der Stickstoff der Stahlflasche, nachdem er das erste Druckreduzierventil passiert hatte, durch ein sorgfältig gestopftes Watterohr geleitet, um eventuelle Staubteilchen aus der Bombe abfangen zu können. Sämtliche Komponenten der flüssigen, beweglichen Phasen wurden vor Gebrauch sorgfältig durch Filtrieren, bzw. Zentrifugieren, von Schwebeteilchen befreit. Trotz obiger Vorsichtsmassnahmen kann es vorkommen, dass kleine Fremdkörper beim Nachfüllen in die Glaskapillaren gelangen können. Durch Verkanten oder bei den kleinsten Unregelmässigkeiten im Querschnitt der Glaskapillare können sich diese Fremdpartikelchen festsetzen. Es bildeten sich auf diese Weise Pfropfen aus, welche teilweise eine Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit bis zu 100 % bewirkt haben. Solche Pfropfen innerhalb der Glaskapillare kann man oft mit blossem Auge aufspüren. Will man die Glaskapillare in ihrer vollen Länge weiterhin benützen, so gibt es zur Beseitigung dieser Pfropfen drei Möglichkeiten: Druck oder Hitze, oder Druck und Hitze. Die oben beschriebene Apparatur - Einspritzblock und Kapillare - kann man unter Beachtung besonderer Vorsichtsmassnahmen mit Stickstoff bis zu 10 atü Innendruck belasten. Bei einem solch hohen Druck besteht jedoch die Gefahr, dass die Kapillarendichtung versagt. Konnte man durch Druck den Sperrpfropfen nicht wieder zum Strömen bringen, so bestand die zweite Möglichkeit, mit Hilfe von Hitze eine Deformierung des Fremdkörpers zu versuchen, z.B. durch Schmelzen oder Verkohlen.

Wenn man zuvor die Druckanlage entspannt, kann man die Glaskapillare bis an die Grenze ihrer Erweichungstemperatur erhitzen. Die Kombination beider Verfahren stellt eine gegenseitige Ergänzung und Steigerung der Mittel dar; jedoch muss hier beim Erhitzen ein grösserer Temperaturabstand vom Erweichungspunkt des Glases eingehalten werden. Beim Verdampfen einer der Komponenten der flüssigen, beweglichen Phase entsteht bereits ein höherer Innendruck als zuvor; durch das anschliessende Kondensieren des Dampfes tritt eine Druckwelle in Richtung des Fremdteilchens auf. Auf diese Weise kann man versuchen, Fremdkörperchen aus der Glaskapillare zu entfernen.

Eine andere Schwierigkeit trat auf, als versucht wurde, Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser als flüssige, bewegliche Phase zu verwenden. Eine Lösung aus 17 % Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser (7:3) hat eine sehr grosse Viskosität und hat damit bei den engen Glaskapillaren von 0,1 bis 0,2mm Innendurchmesser bei dem üblichen Arbeitsdruck eine sehr geringe Durchflussgeschwindigkeit. Gleichzeitig ist die Tendenz sehr gross, dass sich innerhalb der Glaskapillare aus der 17 %igen Lösung Polyäthylenglykol 4000 abscheidet und somit einen erhöhten Strömungswiderstand bildet. Parallel dazu fällt bei konstantem Druck die Durchflussmenge an flüssiger, beweglicher Phase ab. Die Kenngrössen des Diagrammes ändern sich nicht nur von Anfang an ständig, sondern die Säule wird allmählich durch ausgeschiedenes Polyäthylenglykol 4000 völlig verstopft.

Es war aus diesem Grunde unmöglich, analog zu den Untersuchungen bei der Kupferkapillare R_F-Werte zu bestimmen, bei welchen die flüssige, bewegliche Phase aus 17 % Polyäthylenglykol 4000 in Äthanol/Wasser (7:3) bestand. Ein Zusatz von 3 % Polyäthylen-

glykol 4000 zu Äthanol/Wasser (7:3) ergab R_F-Werte, welche geringer waren als die mit reinem Äthanol/Wasser-Gemisch. Bei den Kupferkapillaren traten ebenfalls bei geringem Zusatz an Polyäthylenglykol 4000 geringere R_F-Werte auf als bei Messungen mit reinem Äthanol/Wasser-Gemisch. In Tabelle 9 und Abbildung 14 sind die R_F-Werte der Untersuchungen an Glaskapillaren mit 3 % Polyäthylenglykol 4000-Zusatz aufgezeigt.

Substanz	C-Atome	R_F-Wert	
DL-Valin	5	0,50	1)
DL-Alanin	3	0,46	2)
Glycin	2	0,43	3)

Tab. 9: Flüssige, bewegliche Phase: 3 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3).

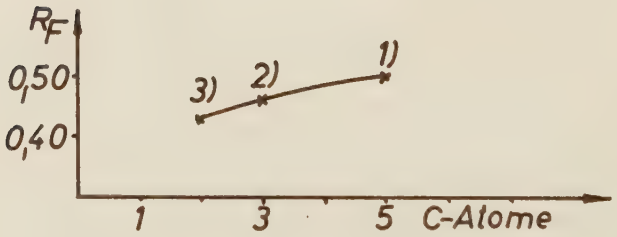


Abb. 14: Beziehung zwischen R_F-Wert und Kohlenstoffzahl. Flüssige, bewegliche Phase: 3 % Polyäthylenglykol 4000 in 96 %igem Äthanol/Wasser (7:3). Werte der Tab. 9.

2. Glaskapillaren mit Füllkörper.

a. Herstellung.

Mit der Schaffung der Glasziehmaschine wurde es auch möglich, eine gefüllte "Säule" mit kleinstem Durchmesser für die Säulen-Chromatographie herzustellen. Man kann gefüllte Glaskapillaren erhalten, wenn man die oben beschriebene Glasziehmaschine so aufstellt, dass sich das Ausgangsglaskapillarrohr in der Horizontalen befindet und dabei die Ausgangskapillare an ein Reservoir mit Füllmaterial angeschlossen und in leichte Vibration gesetzt wird. Der Innendurchmesser einer gefüllten Glaskapillare muss mindestens so gross sein wie der Aussendurchmesser der Füllkörper. Es ist so möglich, "Chromatographie-Ringe" mit einem Innendurchmesser von etwa 0,25 mm herzustellen. Sie wurden einmal gefüllt mit Kieselgel für die Chromatographie der Körnung 0,05 bis 0,2 mm, das andere Mal mit Kieselgur der Korngrösse 0,125 bis 0,2 mm.

Das Füllmaterial darf beim Ziehprozess kein Wasser abgeben, da dieses bei solch hoher Temperatur in Dampf übergehen würde. Ein entstehendes Dampfvolumen im Ziehbereich würde die gleichmässige Packungsdichte stören und ergäbe in der neu gezogenen Glaskapillare freibleibende Zwischenräume. Aus diesem Grunde wurden die Sorptionsmittel auf 500° C erhitzt und 24 Stunden im Hochvakuum aufbewahrt. Die leichte Vibration der Ausgangsglaskapillare bewirkt eine konstante Packungsdichte und sorgt für das Nachgleiten der Füllkörper in die Glaskapillare, da durch den Ziehprozess eine Volumenvergrösserung erfolgt.

Wie erst gegen Abschluss dieser Arbeit bekannt wurde, hat auch HEINE (32) "gepackte Kapillarkolonnen" für die Kapillar-Gas-Chromatographie mit einem Innendurchmesser von 0,32 bzw. 0,43 mm hergestellt.

Sie wurden ähnlich wie die oben beschriebenen gefüllten Glaskapillaren mit Hilfe einer Glasziehmaschine erhalten. Die Füllungen bei HEINE bestanden aus Aluminiumoxid und aus Chromosorb P.

b. Imprägnierung.

Die mit Kieselgur gefüllte Glaskapillare wurde mit Reoplex 400 imprägniert, während die mit Kieselgel gefüllte Glaskapillare unbelegt benützt wurde.

Da hier aufgrund des Herstellungsverfahrens der gefüllten Glaskapillare die Imprägnierung des Trägermaterials nicht vor dem Glasziehprozess und somit nicht vor dem Einfüllen wie bei der klassischen gepackten Gas-Chromatographie-Trennsäule erfolgen kann, muss die Belegung innerhalb der gefüllten Glaskapillare nach dem Verfahren der Frontimprägnierung (33) vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurde Reoplex 400 mit Chloroform als Lösungsmittel in Form einer 20%igen Lösung durch die gefüllte Glaskapillare gedrückt. Da Kieselgur eine gute und schnelle Adsorptionsfähigkeit besitzt, genügte schon ein kurzfristiges Durchleiten der Imprägnierlösung. Anschliessend wurde über Nacht ein schwacher Stickstoffstrom durch die in einem Rohrofen auf 60° C erwärmte Glaskapillare geleitet, um so das Lösungsmittel herauszudrücken.

c. Phasenuntersuchungen.

Bei den gefüllten Glaskapillaren, sowohl mit Kieselgel als auch mit Kieselgur, ergab sich folgende Schwierigkeit: eine Stickstoffblase, welche bei den bisherigen Versuchen zur Bestimmung der Durchbruchszeit gedient hatte, wandert durch eine gepackte Säule nicht gleichmässig hindurch. Es musste sogar darauf geachtet werden, dass durch längeres Durchleiten von flüssiger, beweglicher Phase bei hohem Druck

jegliche Gasblasen aus der Kapillare herausgedrückt wurden. Gasbläschen innerhalb der gefüllten Glaskapillare verursachen erhebliche Störungen des Chromatogrammablaufes. Es war jedoch nicht möglich, eine einfache Methode zu finden, um die Durchbruchszeit direkt messen zu können. Man kann nur an Hand von Chromatogrammen und Messwerten und im Vergleich mit anderen Säulen auf die Durchbruchszeit schliessen.

Als absolute Grössen können die Länge der gefüllten Glaskapillare und der Durchschnittswert ihrer lichten Weite festgestellt werden, während als variable Grössen die Tropfenzeit und der Gasdruck über der flüssigen, beweglichen Phase gemessen werden können. Durch die Einhaltung einer gleichmässigen Tropfenzeit bei ein und derselben gefüllten Glaskapillare wird auch die Durchbruchszeit konstant gehalten.

Substanz	R_F-Wert DC	R_F-Wert FC	
DL-Phenylalanin	0,63	0,63	1)
DL-Valin	0,55	0,54	2)
Glycin	0,43	0,45	3)
L-Lysin	0,03	0,12	4)

Tab. 10: R_F-Werte in einer mit Kieselgel gefüllten Glaskapillare und auf Kieselgel-Dünnschicht-Platten.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3).

Unter Beachtung obiger Fakten kann man bei der Auswertung der Chromatogramme erkennen, dass die

R_F-Werte der vorausgehenden Tabelle 10, welche man bei einer flüssigen, beweglichen Phase von Äthanol/ Wasser (7:3) und Kieselgel-Füllung erhielt, nur wenig abweichen von jenen R_F-Werten, die sich in der Dünnschicht-Platten-Chromatographie mit Kieselgel und Äthanol/Wasser als Fliessmittel ergaben. In Abbildung 15 sind die R_F-Werte der Tabelle 10 aufgezeigt.

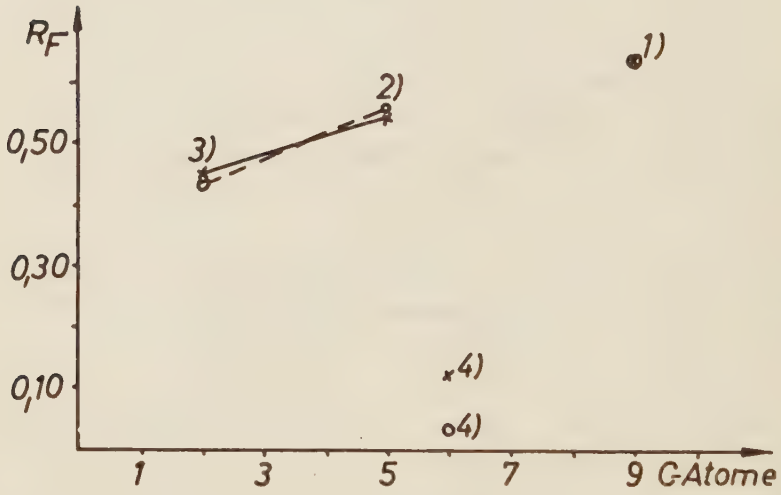


Abb. 15: R_F-Werte in Abhängigkeit von der Kohlenstoffzahl.
Flüssige, bewegliche Phase: 96 %iges Äthanol/Wasser (7:3). Werte der Tab. 10.

In Tabelle 11 sind die R_F-Werte aufgeführt, welche erhalten wurden mit einer flüssigen, beweglichen Phase aus n-Butanol/Wasser (92:8) und einer mit Kieselgur gefüllten Glaskapillare, die mit Reoplex 400 imprägniert worden war. Es zeigte sich auch hier,

dass wie bei der Kupferkapillare mit Abnahme des Wassergehaltes in der flüssig, beweglichen Phase die R_F-Werte kleiner werden.

Substanz	R_F-Wert	
DL-Phenylalanin	0,23	1)
DL-Valin	0,19	2)
DL-Alanin	0,16	3)
Glycin	0,14	4)

Tab. 11: R_F-Werte bei Reoplex 400 auf Kieselgur. Flüssige, bewegliche Phase: n-Butanol/ Wasser (92:8).

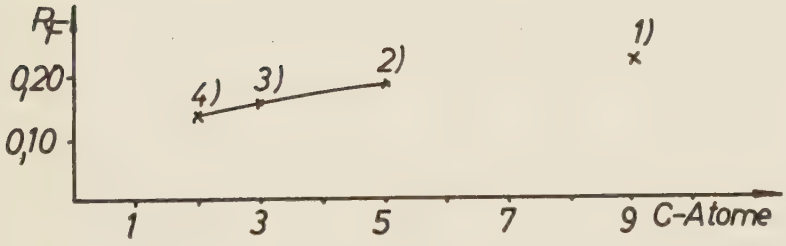


Abb. 16: Beziehung zwischen R_F-Wert und Kohlenstoffzahl.
Flüssige, bewegliche Phase: n-Butanol/ Wasser (92:8). Werte der Tab. 11.

C. DÜNNSCHICHT - CHROMATOGRAPHIE.

Wie aus den vorausgegangenen Untersuchungen über die Kapillaren zur Flüssigkeits-Chromatographie hervorgeht, macht es oft ausserordentliche Schwierigkeiten, die trennaktive Adsorptions- oder Absorptionsschicht auf die Innenfläche der Kapillare zu fixieren. Über Erfolg oder Misserfolg entscheidet dann immer lediglich die Trennung, da eine anderweitige Kontrolle der Trennschicht, z.B. durch mikroskopische Überprüfung, infolge der Unzugänglichkeit der Innenfläche unmöglich ist. Dies erfordert einen ausserordentlichen Arbeitsaufwand, der oft auch in dieser vorliegenden Arbeit zu einem grossen Zeitverlust führte. Aus diesem Grunde wurden Überlegungen angestellt, wie man die Trennschicht aussen anbringen könnte, sodass sie leicht zugänglich ist. Zumindest für Testreihen bei Neuentwicklungen wäre dies sehr vorteilhaft.

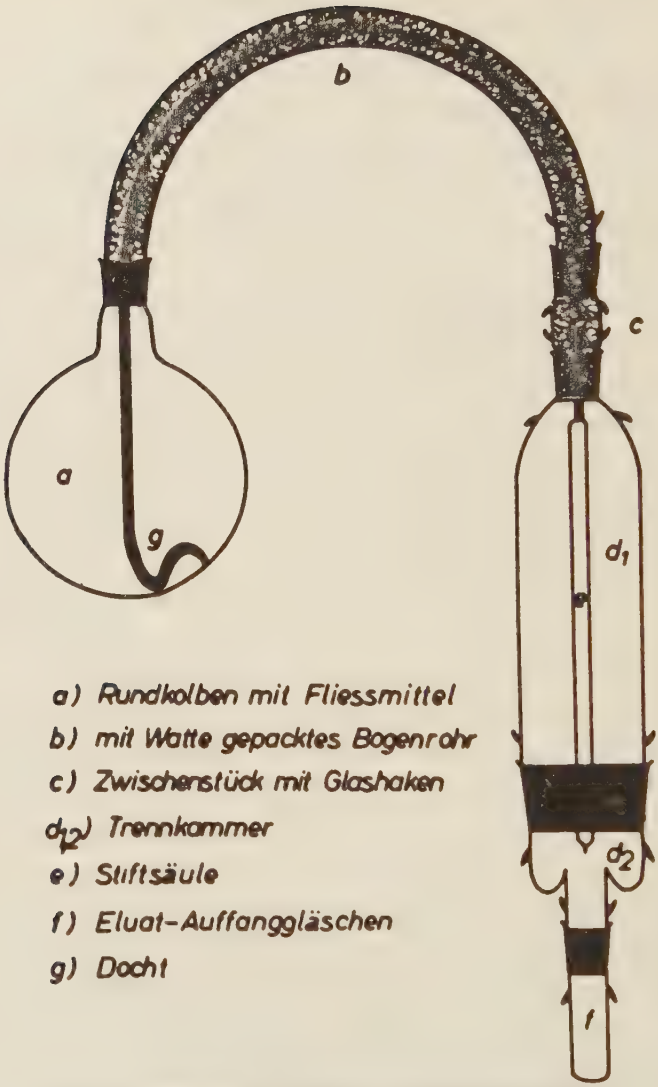
In der Dünnschicht-Chromatographie hat nun FELTKAMP (34) über eine Anordnung berichtet, die zumindest den Grundzug der oben umrissenen Technik trägt. Es handelt sich um die aufsteigende Dünnschicht-Chromatographie am Glasstab.

Bei aufsteigender Entwicklung des Chromatogramms erlaubt es diese Technik jedoch nicht, die einzelnen Substanzen im Durchlaufverfahren zu isolieren. Es wurde nun innerhalb dieser Arbeit ein einfaches Gerät entwickelt, welches es ermöglicht, Substanztrennungen durch absteigende Entwicklung an aussen beschichteten Stäben, den sogenannten Stiftsäulen, auszuführen und dabei gleichzeitig die einzelnen Eluate aufzufangen.

I. Gerät zur Stiftsäulen-Chromatographie.

Die folgende Abbildung 17 veranschaulicht die Apparatur zur Stiftsäulen-Chromatographie. Die Trennflüssigkeit befindet sich in einem Rundkolben (a), welcher als Vorratsbehälter dient. Sie wandert über einen Docht durch das mit Watte gepackte Bogenrohr(b) in die Trennkammer (d). Die freie zentrierte Aufhängung des Glasstiftes (e) erfolgt in sehr einfacher Weise. In die Stiftsäulenachse wurde ein dünner Platindraht eingeschmolzen und dessen freies Ende zu einem Häkchen gebogen. Gleichzeitig befand sich ein eingeschmolzener Glashaken in dem Glasstück (c) zwischen Bogenrohr und Trennkammer. Um eine gleichmässige Zuflussgeschwindigkeit der Trennflüssigkeit zu erhalten, ist es wichtig, dass der dort endende Docht unmittelbar auf der Stiftkuppe bei der Sorptionsschicht endet und bis dorthin mit Watte umgeben wird.

Die Trennkammer muss folgenden Anforderungen genügen: einerseits muss in ihr eine gewisse Menge der Trennflüssigkeit gespeichert werden können, um eine gute Sättigung des Innenraumes mit Lösungsmitteldämpfen zu erhalten; andererseits muss eine sehr schnelle und leichte Auswechslung der Eluat-Auffanggläschen möglich sein. Deshalb wurde die Trennkammer aus zwei Teilen aufgebaut, welche wie die gesamte Apparatur durch Normschliffe miteinander verbunden sind. An ein zylindrisches Glasrohr (d_1) von etwa gleicher Länge wie die Stiftsäule schliesst der Flüssigkeitsbehälter (d_2) in Form eines Ringtroges an, in dessen Zentrum ein Schliffkern eingeschmolzen ist, welcher zur Befestigung des Eluat-Auffanggläschens (f) dient.



a) Rundkolben mit Fliessmittel
b) mit Watte gepacktes Bogenrohr
c) Zwischenstück mit Glashaken
$d_{1,2}$) Trennkammer
e) Stiftsäule
f) Eluat-Auffangglaschen
g) Docht

Abb. 17: Gerät zur Stiftsäulen-Chromatographie

II. Beschichtung der Stiftsäule.

Zur Herstellung der Trennschicht wurden 10 g Kieselgel G der Firma Merck mit 28 ml wasserfreiem Chloroform angerieben und in einen Standzylinder gefüllt. Die zu beschichtende Stiftsäule mit einer Länge von 120 mm und einem Durchmesser von 4 mm wird in die Suspension ganz eingetaucht. Das anschliessende Herausziehen muss gleichmässig und ohne Berührung mit der Gefässwand erfolgen. Es ist darauf zu achten, dass die Schicht bis an den über den Platindraht gezogenen Docht an der oberen Kuppe reicht. Wenn das Lösungsmittel weitgehend verdunstet ist, hängt man die Stiftsäule etwa 5 Minuten über siedendes Wasser und anschliessend 30 Minuten in einen Trockenschrank bei 110° C. Die Einwirkung von Wasserdampf auf die gipshaltige Kieselgelschicht im Zeitraum von 5 Minuten macht die mit Chloroform sehr gleichmässig aufgezogene Schicht am Glas haftfester.

III. Substanzuntersuchungen.

Die Substanzen wurden möglichst punktförmig etwa 5 mm unterhalb der oberen Kuppe auf die Stiftsäule aufgetragen. Man kann hierzu eine bereits erwähnte Hamilton-Spritze verwenden, wodurch eine genaue Dosierung möglich ist.

Zunächst einmal wurde das Testgemisch nach STAHL (35), das aus Buttergelb, Sudanrot G und Indophenol besteht, aufgetragen. Als Fliessmittel diente Benzol. Sobald die Fliessmittelfront das Ende der Stiftsäule erreicht hatte, wurde eine Zwischenbestimmung der R_F-Werte vorgenommen. Es ergaben sich praktisch die selben R_F-Werte, wie sie bei aufsteigender Chromatographie erhalten worden waren.

Nach diesen Farbstoffversuchen wurden Aminosäuren eingesetzt. Pro Aminosäure wurden 3 γ Substanz

aufgetragen und als Fliessmittel 96 %iges Äthanol/ Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 7:3 verwandt. Zur R_F-Wert-Bestimmung wurden die Substanzfronten mit Ninhydrin-Sprühreagenz entwickelt, sobald sich die Fliessmittelfront dem Stabende genähert hatte. Es ergaben sich folgende R_F-Werte der Tabelle 12.

Substanz	C-Atome	R_F-Wert	
DL-Phenylalanin	9	0,63	1)
L-Glutaminsäure	5	0,62	2)
DL-Valin	5	0,54	3)
Glycin	2	0,42	4)
L-Cystin	6	0,40	5)
L-Lysin	6	0,12	6)

Tab. 12: R_F-Werte einer mit Kieselgel G beschichteten Stiftsäule.
Fliessmittel: 96 %iges Äthanol/Wasser(7:3).

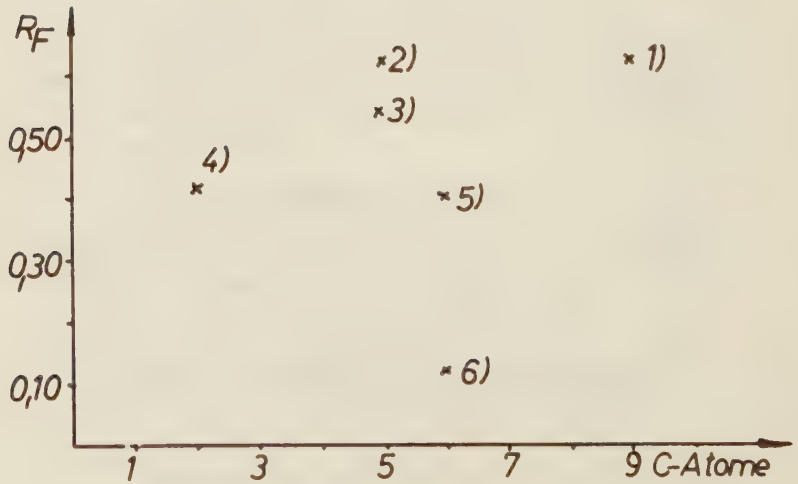


Abb. 18: Aufgetragene Werte der Tab. 12.

Als Trennungen liefen unter anderem die Aminosäurekombination Valin - Cystin sauber und konnten im Auffanggläschen mit Ninhydrin-Reagenz nachgewiesen werden.

Nachdem an solchen beschichteten Glassäulen die prinzipielle Verwendbarkeit der Apparatur aufgezeigt worden ist, sollten sich mit Stiftsäulen aus den verschiedenen Materialien die bei den Kapillaren angegebenen Behandlungsmethoden besser und schneller überprüfen lassen.

D. ZUSAMMENFASSUNG.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Trennzeiten bei der Flüssigkeits-Chromatographie zu beschleunigen, um zu solchen Trennzeiten zu gelangen, wie sie bei der Gas-Chromatographie erreichbar sind. Wegen ihrer Permeabilität bieten sich Kapillaren für die Flüssigkeits-Chromatographie an.

Es konnte theoretisch errechnet werden, dass das Optimum der Flüssigkeits-Chromatographie bei wesentlich kürzeren Trennzeiten liegt, als sie heute üblicherweise experimentell benützt werden.

Während in der Gas-Chromatographie nur Substanzen getrennt werden können, welche unzersetzt verdampfbar sind, wird es durch die Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie möglich, auch nicht dem Verfahren der Kapillar-Gas-Chromatographie unterwerfbare Substanzen zu trennen.

Voraussetzung zu den Versuchen in der Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie war die Schaffung notwendiger Kernapparaturen, wie Einspritzblock und aktive Trennkapillaren, welche das Arbeiten mit kleinsten Substanzmengen erlauben.

Als Trennsäulen wurden in dieser Arbeit für die Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie Kupfer-, Aluminium- und Glaskapillaren näher untersucht und angewandt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie sowohl die Adsorptions-Chromatographie als auch die Verteilungs-Chromatographie auftreten können. Die Leistungsfähigkeit der einzelnen Säulen ist daher nicht nur von der Schaffung aktiver Oberflächenschichten bestimmt; auch die Wahl der Trennflüssigkeiten und ihrer prozentualen Zusammensetzung kann dieses Ver-

fahren günstig beeinflussen.

Die Schwierigkeiten bei der Herstellung der aktiven Oberflächenschichten liegen im Material der Kapillarsäulen begründet. Während Glas- und insbesondere Kupferkapillaren zu günstigen Ergebnissen führten, zeigen sich besonders bei der Aluminiumkapillare Schwierigkeiten, wo das Metall infolge der raschen Passivierung die Bildung einer guten aktiven Oberflächenschicht erschwert.

Am Beispiel der Trennung von Aminosäuren wurden die Vorteile dieses neuen Verfahrens demonstriert. Die Trennungen liegen etwa bei einer Stunde. Die heute gebräuchlichen Trennverfahren (z.B. Ionenaustauschmethode, Stärkesäule) für Aminosäuren dauern ein bis zwei Tage. Mittels Gas-Chromatographie können Aminosäuren auch als Derivate nicht bestimmt werden.

Prinzipiell ist dieses Verfahren auf alle Substanzklassen ausdehnbar und könnte bei Schaffung eines geeigneten Detektors auch vollautomatisch gestaltet werden.

E. LITERATURVERZEICHNIS.

1) Brunschwig, H., Liber de arte distillandi (1512)

2) Martin, A.J.P., and R.L.M.Synge, Biochem.J. 35, 1358 (1941)

3) Bayer, E., Gas-Chromatographie, 2.Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 8

4) Moore, S., and W.H.Stein, Ann.New York Acad.Sci. 49, 265 (1949)

5) Daly, M.m., and A.E.Mirsky, J.Biol.Chem., 179, 981 (1949)

6) Stahl, E., Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 415

7) Deemter, J.J.van, F.J.Zuiderweg, A.Klinkenberg, Chem.Eng.Sci. 5, 271 (1956)

8) Keulemans, A.I.M., and A.Kwantes, in D.H.Desty: Vapour Phase Chromatography, Butterworths Scientific Publ., London 1957, S. 15

9) Jones, W.L., Analyt.Chem. 33, 829 (1961)

10) Golay, M.J.E., in D.H.Desty: Gas Chromatography, Butterworths Scientific Publ., London 1958, S. 36

11) Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase, Bd.II Kapillar-Chromatographie, Bibliographisches Institut, Mannheim 1961, S. 14

12) Keulemans, A.I.M., Gas-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1959, S. 118

13) Bayer, E., Gas-Chromatographie, 2.Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 40

Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase, Bd.II Kapillar-Chromatographie, Bibliographisches Institut, Mannheim 1961, S. 82

14) Bayer, E., Gas-Chromatographie, 2.Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 47
Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase, Bd.I Gas-Chromatographie, Bibliographisches Institut, Mannheim 1960, S. 47
15) Henglein, F.A., Grundriss der Chemischen Technik, 10.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1959, S. 39
16) Gerthsen, Ch., Physik, 4.Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1956, S. 81
17) Ruhemann, S., J.Chem.Soc. 97, 1438 (1910)
18) Mais, I.M., und K.Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd.I, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958, S. 417
19) Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase, Bd.II Kapillar-Chromatographie, Bibliographisches Institut, Mannheim 1961, S. 53
20) Golay, M.J.E., in D.H.Desty: Gas Chromatography, Butterworths Scientific Publ., London 1958, S. 37
21) Dijkstra, G., and I.De Goey, in D.H.Desty: Gas Chromatography, Butterworths Scietific Publ., London 1958, S. 56
22) Halász, I., und G.Schreyer, Chem.Ing.Tech. 32, 680 (1960)
23) Mack, H., Dissertation, T.H. Karlsruhe 1963, S.78
24) Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase, Bd.II Kapillar-Chromatographie, Bibliographisches Institut, Mannheim 1961, S. 68
25) Consden, R., A.H.Gordon, and A.J.P.Martin, Biochem.J. 38, 224 (1944)
26) Keulemans, A.I.M., Gas-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1959, S. 104

27) Petitjean, D.L., and C.J.Leftault,Jr., J.Gas Chromatography, Vol. 1, No. 3, 18 (1963)

28) Fernandez-Ladrela, J.M., Chem.Zentralbl. 1934 II, 2976

29) Desty, D.H., J.N.Haresnape, and B.H.F.Whyman, Analyt.Chem. 32, 302 (1960)

30) Kreyenbuhl, A., Bull.soc.chim. France 1960, 2125

31) Mohnke, M. und W.Saffert, in M.van Swaay: Gas Chromatography 1962, Butterworths Scientific Publ., London 1962, S. 216

32) Heine, E., Dissertation, Univ. Frankfurt/M. 1963

33) Smith, D.E., Analyt.Chem. 32, 1049 (1960)

34) Feltkamp, H., Dtsch.Apotheker-Ztg. 102, 1269 (1962)

35) Stahl, E., Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 30

L e b e n s l a u f

Am 20. Juli 1936 wurde ich als Sohn des Diplom-Kaufmanns Fritz Kühlewein und seiner Ehefrau Carola, geborene Münz, in Karlsruhe geboren.

In Gernsbach, dem Wohnsitz meiner Eltern, besuchte ich seit 1942 die Volksschule, anschliessend das dortige Progymnasium und legte 1956 am Markgraf-Ludwig-Gymnasium in Baden-Baden die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1956 begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Fridericiana in Karlsruhe. Im Februar 1959 bestand ich die Diplom-Vorprüfung und im Mai 1961 die mündliche Diplom-Hauptprüfung. Meine Diplomarbeit über das Thema "Reduktionsversuche an Acetoacetylpyrrolen" fertigte ich im Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe unter Leitung von Herrn Professor Dr. E. Bayer an und beendete sie im Januar 1962.

Seit April 1962 war ich mit der Durchführung meiner Doktorarbeit zunächst noch an der Technischen Hochschule in Karlsruhe und seit Oktober 1962 im Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: E. Bayer, R. Criegee, K. Hasse, E. Vogel, R. Scholder, R. Dworzak, G. Denk, P. Günther, W. Zeil, W. Seelmann-Eggebert, F.A. Henglein, W. Berdesinski, Chr. Gerthsen und H. Schubart.

Druck: O. Berenz, Karlsruhe